

**Charakterisierung des viszeralen Fettes als Quelle
von Adipozytokinen und Untersuchungen zur
Funktion dieser Proteine im Kontext von Typ 2
Diabetes mellitus**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin der Universität
Regensburg**

vorgelegt von
Johanna Weigert aus Grafrath
Juli 2009

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2006 bis Juli 2009 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von Frau PD Dr. Christa Büchler.

Promotionsgesuch eingereicht am 21.07.2009

Kolloquium am 11.12.2009

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Frank Sprenger
	Erstgutachter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
	Zweitgutachter:	PD Dr. Christa Büchler
	Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Ernst R. Tamm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	x
1 Einleitung	1
1.1 Die Adipositas und das Metabolische Syndrom	1
1.1.1 Das Metabolische Syndrom	1
1.1.2 Die Adipositas	1
1.2 Das Fettgewebe	3
1.2.1 Aufbau und Funktion des Fettgewebes	3
1.2.2 Die Rolle des Fettgewebes als endokrines Organ	3
1.2.3 Adipozytokine in der Adipositas	4
1.2.4 Die Rolle des viszeralen Fettgewebes in der Adipositas	6
1.2.4.1 Die Rolle des viszeralen Fettgewebes in der Insulinresistenz	6
1.2.4.2 Die Rolle des viszeralen Fettgewebes in der Entzündung	8
1.3 Medikamente zur Verbesserung der Insulinresistenz	9
1.3.1 Metabolische Effekte von Metformin	10
1.3.2 Metabolische Effekte von Fenofibrat	11
1.3.3 Metabolische Effekte von Glitazonen	12
1.4 Aldehydoxidase 1	13
1.5 Superoxid-Dismutase 2	13
1.6 Annexin A6	14
1.7 Omentin	15
1.8 Galectin 3	16
1.9 Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1	17
1.10 Ziel dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20

2.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Puffer und Lösungen	24
2.1.4.1	Lösungen für Arbeiten mit DNA	24
2.1.4.2	Lösungen für Arbeiten mit RNA	25
2.1.4.3	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	25
2.1.4.3.1	Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten	25
2.1.4.3.2	Lösungen für SDS-PAGE	26
2.1.4.3.3	Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen [187]	27
2.1.4.3.4	Lösungen für Western-Blotting	28
2.1.4.3.5	Lösungen für ELISAs	29
2.1.4.4	Lösungen für Oil Red O Färbung	31
2.1.4.5	Lösungen für immunhistologische Färbungen	31
2.1.5	Kulturmedien	32
2.1.5.1	Medien für eukaryontische Zellen	32
2.1.5.1.1	Medien für Insektenzellen	32
2.1.5.1.2	Medien für Säugerzellen	32
2.1.5.2	Medien für <i>E.coli</i>	33
2.1.6	Enzyme	34
2.1.7	Antikörper	34
2.1.7.1	Primäre Antikörper	34
2.1.7.2	Sekundäre Antikörper	35
2.1.8	Kit-Systeme	35
2.1.9	Organismen	36
2.1.9.1	Insektenzellen	36
2.1.9.2	Eukaryontische Zellen	36
2.1.9.3	Bakterien	36
2.1.10	RNA	37
2.1.11	Plasmide	37
2.1.12	Oligonukleotide	37
2.1.12.1	Primer für die Klonierung	37
2.1.12.2	Primer für die Sequenzierung	38
2.1.12.3	Primer für LightCycler-Analysen	38
2.1.12.3.1	Oligonukleotide zur Amplifikation humaner Gene	38

2.1.12.3.2	Oligonukleotide zur Amplifikation muriner Gene	39
2.1.12.3.3	Oligonukleotide zur Amplifikation von Ratten-Genen	39
2.1.13	siRNA-Sequenzen	40
2.1.14	Rekombinante Proteine	40
2.1.15	Proteinextrakte	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Kultivierung von Zellen	41
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	41
2.2.1.2	Kultivierung von Insektenzellen	41
2.2.1.3	Kultivierung humaner Zelllinien	41
2.2.1.4	Kultivierung muriner Zelllinien	42
2.2.1.4.1	Kultivierung von 3T3-L1 Zellen	42
2.2.1.4.2	Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten	43
2.2.1.4.3	Stimulation von 3T3-L1 Zellen	43
2.2.1.4.4	Transfektion von 3T3-L1 Zellen mit siRNA	44
2.2.1.4.5	Transfektion von 3T3-L1 Zellen mit Plasmid-DNA	44
2.2.1.5	Kultivierung von primären humanen Zellen	45
2.2.1.5.1	Kultivierung von primären humanen Adipozyten	45
2.2.1.5.2	Kultivierung von primären humanen Hepatozyten	45
2.2.2	Arbeiten mit DNA	46
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	46
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	46
2.2.2.3	Agarosegelelektrophorese	47
2.2.2.4	Reinigung von DNA	47
2.2.2.4.1	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	47
2.2.2.4.2	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	47
2.2.2.5	Inkubation mit Restriktionsenzymen	48
2.2.2.6	Inkubation mit Alkalischer Phosphatase	48
2.2.2.7	Ligation	48
2.2.2.8	Klonierung mit Hilfe der Cre-Rekombinase	48
2.2.2.9	Transformation von <i>E.coli</i>	49
2.2.2.10	Polymerase Chain Reaction (PCR)	50
2.2.2.11	DNA-Sequenzierung	50
2.2.2.12	Real-Time RT-PCR	51

2.2.3	Arbeiten mit RNA	53
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen	53
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	53
2.2.3.3	Reverse Transkription	54
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	54
2.2.4.1	Präparation von Proteinextrakten	54
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	55
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.2.4.4	Silberfärbung	56
2.2.4.5	Western-Blotting	56
2.2.4.6	Coomassie-Färbung	57
2.2.4.7	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	58
2.2.4.8	Bestimmung des Zelltodes	58
2.2.4.9	Oil Red O Färbung	59
2.2.4.10	Immunhistochemische Färbung	59
2.2.4.11	In vitro Translation	60
2.2.5	Rekombinante Expression von Omentin in H5 Insektenzellen	61
2.2.5.1	Expression rekombinanter Proteine im Bakulovirus Expressionssystem	61
2.2.5.2	Klonierung der Omentin cDNA in den pLP-BacPak9 Expressionsvektor	61
2.2.5.3	Generierung rekombinanter Bakuloviren	62
2.2.5.4	Infektion von Insektenzellen	63
2.2.5.5	Reinigung des rekombinanten Omentin	64
2.2.6	Expressionsanalyse mit Affymetrix GeneChip®	65
2.2.7	Tiermodelle	66
2.2.7.1	Mäuse	66
2.2.7.2	Hochfettratten	66
2.2.7.3	Zuckerratten	67
2.2.8	Humane Proben	68
2.2.8.1	Humane Serumproben	68
2.2.8.2	Humane Fettgewebeproben	69
2.2.9	Statistische Auswertungen	71
3	Ergebnisse	72
3.1	Aldehydoxidase 1	72

3.1.1	Expression der Aldehydoxidase 1 im Fettgewebe	72
3.1.1.1	Expression der Aldehydoxidase 1 im humanen Fettgewebe	72
3.1.1.2	Expression der Aldehydoxidase 1 im subkutanen und viszerale Fettgewebe der Maus	75
3.1.1.3	Expression der Aldehydoxidase 1 im viszerale Fettgewebe der Hochfettratte	76
3.1.1.4	Expression der Aldehydoxidase 1 im Fettgewebe der Zuckerratte	78
3.1.2	Expression der Aldehydoxidase 1 in Adipozyten	79
3.1.2.1	Expression der Aldehydoxidase 1 in primären humanen Adipozyten	79
3.1.2.2	Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten	81
3.1.2.2.1	Expression der Aldehydoxidase 1 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten	81
3.1.2.2.2	Regulation der Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten	84
3.1.2.2.2.1	Einfluss von Acetylsalicylsäure und LPS auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten	84
3.1.2.2.2.2	Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten	84
3.1.2.2.2.3	Einfluss von Fettsäuren auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten	85
3.1.2.2.2.4	Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten	86
3.1.2.2.3	Effekte des Knock-downs der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Zellen	89
3.2	Superoxid-Dismutase 2	93
3.2.1	Expression der Superoxid-Dismutase 2 im Fettgewebe	93
3.2.1.1	Expression der Superoxid-Dismutase 2 im humanen Fettgewebe	93
3.2.1.2	Expression der Superoxid-Dismutase 2 im subkutanen und viszerale Fettgewebe der Maus	94
3.2.1.3	Expression der Superoxid-Dismutase 2 im viszerale Fettgewebe der Hochfettratte	94
3.2.1.4	Expression der Superoxid-Dismutase 2 im Fettgewebe der Zuckerratte	95
3.2.2	Expression der Superoxid-Dismutase 2 in Adipozyten	96
3.2.2.1	Expression der Superoxid-Dismutase 2 in primären humanen Adipozyten	96
3.2.2.2	Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten	97

3.2.2.2.1	Expression der Superoxid-Dismutase 2 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten	97
3.2.2.2.2	Regulation der Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten	97
3.2.2.2.2.1	Einfluss von Acetylsalicylsäure und LPS auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten	97
3.2.2.2.2.2	Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten	98
3.2.2.2.2.3	Einfluss von Fettsäuren auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten	98
3.2.2.2.2.4	Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten	100
3.2.2.2.3	Effekte des Knock-downs der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Zellen	101
3.3	Annexin A6	104
3.3.1	Expression von Annexin A6 im Fettgewebe	104
3.3.1.1	Expression von Annexin A6 im humanen Fettgewebe	104
3.3.1.2	Expression von Annexin A6 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus	105
3.3.1.3	Expression von Annexin A6 im viszeralen Fettgewebe der Hochfett Ratte	105
3.3.1.4	Expression von Annexin A6 im Fettgewebe der Zuckerratte	106
3.3.2	Expression von Annexin A6 in Adipozyten	107
3.3.2.1	Expression von Annexin A6 in primären humanen Adipozyten	107
3.3.2.2	Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten	108
3.3.2.2.1	Expression von Annexin A6 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten	108
3.3.2.2.2	Regulation der Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten	108
3.3.2.2.2.1	Einfluss von LPS auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten	108
3.3.2.2.2.2	Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten	109
3.3.2.2.2.3	Einfluss von Fettsäuren auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten	109
3.3.2.2.2.4	Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten	109

3.3.2.2.3	Effekte der Überexpression von Annexin A6 in 3T3-L1 Zellen	109
3.4	Omentin	114
3.4.1	Generierung eines polyklonalen Anti-Omentin Antikörpers	114
3.4.2	Etablierung eines Omentin ELISA	115
3.4.3	Expression von Omentin im Fettgewebe	115
3.4.3.1	Expression von Omentin im humanen Fettgewebe	115
3.4.3.2	Expression von Omentin im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus	116
3.4.3.3	Expression von Omentin im viszeralen Fettgewebe der Hochfettratte	117
3.4.4	Expression und Reinigung von rekombinantem Omentin	117
3.4.5	Einfluss von Omentin auf primäre humane Hepatozyten	119
3.5	Galectin 3	123
3.5.1	Expression von Galectin 3 im Fettgewebe	123
3.5.1.1	Expression von Galectin 3 im humanen Fettgewebe	123
3.5.1.2	Expression von Galectin 3 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus	124
3.5.2	Expression von Galectin 3 in Adipozyten	124
3.5.2.1	Expression von Galectin 3 in primären humanen Adipozyten	125
3.5.2.2	Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten	126
3.5.2.2.1	Expression von Galectin 3 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten	126
3.5.2.2.2	Regulation der Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten	127
3.5.2.2.2.1	Einfluss von LPS auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten	127
3.5.2.2.2.2	Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten	127
3.5.2.2.2.3	Einfluss von Fettsäuren auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten	128
3.5.2.2.2.4	Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten	129
3.5.2.2.3	Effekte des Knock-downs von Galectin 3 in 3T3-L1 Zellen	130
3.5.3	Galectin 3 im humanen Serum	133
3.5.4	Einfluss von Galectin 3 auf primäre humane Hepatozyten	140

3.6	Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1	142
3.6.1	Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im humanen Fettgewebe und in primären humanen Adipozyten	142
3.6.2	Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im Fettgewebe der Maus und in murinen 3T3-L1 Adipozyten	144
3.6.2.1	Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus	144
3.6.2.2	Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten	144
3.6.2.2.1	Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten	144
3.6.2.2.2	Regulation der Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten	145
3.6.2.2.2.1	Einfluss von LPS auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten	145
3.6.2.2.2.2	Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten	146
3.6.2.2.2.3	Einfluss von Fettsäuren auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten	146
3.6.2.2.2.4	Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten	147
3.6.3	Chemerin im humanen Serum	148
3.6.4	Einfluss von Chemerin auf primäre humane Hepatozyten	156
4	Diskussion	158
4.1	Expression der untersuchten Proteine im Fettgewebe	158
4.1.1	Depotspezifische Expression im subkutanen und viszeralen Fettgewebe	158
4.1.2	Expression in der Adipositas und in der Insulinresistenz	160
4.2	Regulation der untersuchten Proteine in der Adipogenese	162
4.3	Einfluss insulinsensitivierender Medikamente auf die Expression der untersuchten Proteine	168
4.4	Serumkonzentration und Einfluss der untersuchten Adipozytokine auf die Leber	169

5	Zusammenfassung	173
6	Publikationen und Kongressbeiträge	176
6.1	Publikationen	176
6.1.1	Erstautorenschaften	176
6.1.2	Koautorenschaften	177
6.1.3	Eingereichte Publikationen	180
6.2	Kongressbeiträge	180
7	Literaturverzeichnis	185

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	<i>ATP Binding Cassette Transporter 1</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACEI	<i>Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor</i>
AcNPV	<i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus
AdipoR1	Adiponektinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
ADRP	Adipophilin (<i>Adipose Differentiation-Related Protein</i>)
AGE	<i>Advanced Glycation End-Products</i>
AK	Antikörper
AKT	Protein Kinase B (PKB)
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AMPK	<i>Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
AMV-RT	<i>Avian Myoblastosis Virus Reverse Transcriptase</i>
AOH1-3	<i>Aldehyde Oxidase Homologue 1-3</i>
AOX1	Aldehydoxidase 1
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APM	Adiponektin
ApoB, E, AI, AII, AV	Apolipoproteine B, E, AI, AII, AV
APS	Ammoniumpersulfat
ARB	<i>Angiotensin II Receptor Blocker</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BMI	Körpermassenindex [kg/m ²] (<i>Body Mass Index</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CD163	CD163 Antigen (<i>Hemoglobin Scavenger Receptor</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein alpha</i>
C/EBP β	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein beta</i>
C/EBP δ	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein delta</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>
CMKLR1	<i>Chemokine-Like Receptor 1</i>
Cp	<i>Crossing Point</i>
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCL8	Interleukin 8
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (p44)</i>
ERK2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 (p42)</i>
et al.	et alii (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
E _x	Extinktion bei Wellenlänge x
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FABP4	<i>Fatty Acid-Binding Protein 4</i>
FFA	freie Fettsäure (<i>Free Fatty Acid</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GLUT 4	Glukosetransporter 4
h	Stunden
HCC	Leberzellkarzinom (<i>Hepatocellular Carcinoma</i>)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HF	Hochfettdiät
HMW	<i>High Molecular Weight Form</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>Inhibitor of NF-κB Kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8 (CXCL8)
IL-10	Interleukin 10
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
K	Kontrolle
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KF	Kokosnussfettdiät
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB	Luria-Broth
LBP	<i>LPS-Binding Protein</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight Form</i>
loxP	<i>Locus of Crossing Over</i> im Genom des Bakteriophagen P1
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)

mAK	monoklonaler Antikörper
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1 (CCL2)</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Metf	Metformin
min	Minuten
MIP1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha</i>
MMW	<i>Medium Molecular Weight Form</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAFLD	<i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Non Alcoholic Steatohepatitis</i>
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
n.s.	nicht signifikant
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
n.v.	nicht vorhanden
OF	Olivenöldiät
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	<i>Plasminogen Aktivator Inhibitor Type 1</i>
pAVK	Periphere arterielle Verschußkrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBST	PBS mit Tween®20
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom (<i>Polycystic Ovary Syndrome</i>)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBP4	<i>Retinol-Binding Protein-4</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds Per Minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunden
sc	subkutanes Fettgewebe (<i>subcutaneous</i>)
SAT	subkutanes Fettgewebe (<i>Subcutaneous Adipose Tissue</i>)
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase 1
SREBP-1c	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>

SOD2	Superoxid-Dismutase 2 (<i>Superoxide Dismutase 2</i>)
SP1	<i>Specificity Protein 1</i>
SP3	<i>Specificity Protein 3</i>
ss	einzelsträngig
ST	Standarddiät (<i>Standard Chow</i>)
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trispuffer (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylethyldiamin
TG	Triglyzerid
TNF α	<i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
Tris-NH ₃	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
U	Unit
ÜN	über Nacht
uni	universe
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAT	viszerales Fettgewebe (<i>Visceral Adipose Tissue</i>)
VDL	Verhältnis von Bauch- zu Hüftumfang (<i>Waist To Hip Ratio</i>)
vis	viszerales Fettgewebe (<i>visceral</i>)
WHR	Verhältnis von Bauch- zu Hüftumfang (<i>Waist To Hip Ratio</i>)
w/v	Volumenprozent (<i>Weight Per Volume</i>)
ZDF	Diabetische Zuckerratte (<i>Zucker Diabetic Fatty Rat</i>)
ZDL	Nicht diabetische Zuckerratte (<i>Zucker Lean Rat</i>)
ZR	Zuckerratte

1 Einleitung

1.1 Die Adipositas und das Metabolische Syndrom

1.1.1 Das Metabolische Syndrom

Das gemeinsame Auftreten von Adipositas mit weiteren klinischen Merkmalen wie Glukoseintoleranz oder Insulinresistenz, Bluthochdruck und atherogener Dyslipidämie, d.h. hohem Triglyzeridspiegel und niedrigem HDL-Cholesterin Spiegel (HDL, *High Density Lipoprotein*), wird als Metabolisches Syndrom bezeichnet und ist für die betroffenen Personen mit einem erhöhten Risiko für Typ 2 Diabetes, Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen und damit einhergehend mit einer erhöhten Mortalität verbunden [1, 2]. Die weite Verbreitung des Metabolischen Syndroms ist auf die zunehmende Prävalenz der Adipositas zurückzuführen [2]. Das Vorliegen einer Adipositas, insbesondere einer viszeralen Adipositas, ist an sich ausreichend für die Ausprägung aller Aspekte des Metabolischen Syndroms [1, 3]. Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen der viszeralen Adipositas und der Entstehung metabolischer Erkrankungen wird daher seit etwa zehn Jahren intensiv untersucht. Das Fettgewebe setzt eine Vielzahl metabolisch aktiver Substanzen frei, welche auf periphere Organe und auch auf Zellen des Immunsystems wirken. In der Adipositas werden diese Substanzen mit wenigen Ausnahmen vermehrt synthetisiert und bewirken peripher eine chronische Entzündung und eine verminderte Insulinsensitivität [4]. Da die vom viszeralen Fettgewebe freigesetzten Substanzen über die Pfortader zunächst in die Leber gelangen, wird angenommen, dass die erhöhten Mengen der von diesem Gewebe abgegebenen Stoffe in der Leber ursächlich für die metabolischen Komplikationen sind [5].

1.1.2 Die Adipositas

Adipositas wird als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts definiert und durch die Berechnung des Körpermasseindex (BMI, *Body Mass Index*) bestimmt. Der BMI stellt den Quotienten aus Gewicht und Körpergröße zum Quadrat (kg/m^2) dar. Gemäß den Leitlinien der Weltgesundheitsorganisation liegt ein Normalgewicht bei einem BMI zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2 vor, während ein BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ als Übergewicht und ein BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ als Adipositas definiert wird [6]. In Deutschland nimmt die Prävalenz der Adipositas kontinuierlich zu. Derzeit gelten etwa

50% der Männer und 35% der Frauen in Deutschland als übergewichtig und ca. 18% der Männer und 20% der Frauen als adipös (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Adipositas-Leitlinie: www.dge.de/leitlinie). Die Ausbildung einer Adipositas kann verschiedene Ursachen haben. Neben der genetischen Prädisposition können auch Medikamente, Stress, Essstörungen und endokrine Erkrankungen eine Gewichtszunahme begünstigen. Als Hauptursache für die zunehmende Prävalenz der Adipositas in den Industrieländern wird jedoch vor allem der moderne Lebensstil mit einer übermäßigen Nahrungsaufnahme und einer geringen körperlichen Aktivität angesehen. Adipositas ist mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko für metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Typ 2 Diabetes und Atherosklerose, aber auch für verschiedene Krebsarten und Immunkrankheiten verbunden [2, 7]. Daneben findet sich bei Patienten mit einer Adipositas bzw. einem metabolischen Syndrom häufig eine hepatische Steatose. Die auch als Fettleber bezeichnete hepatische Steatose wird als benigne eingestuft, begünstigt allerdings die Entstehung einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH, *Non Alcoholic Steatohepatitis*), welche bis zur Leberzirrhose fortschreiten kann [8]. Entscheidend neben dem Ausmaß des Übergewichts, das durch den BMI erfasst wird, ist aber vor allem die Verteilung der Fettgewebssmasse. Die Menge des viszeralen Fettgewebes zeigt eine engere Korrelation mit metabolischen Komplikationen und kardiovaskulären Risikofaktoren als die Menge des Fettgewebes an sich [9-11]. So lässt sich bei normalgewichtigen Personen mit einer erhöhten Menge viszeralen Fettes ebenfalls ein erhöhtes Risiko feststellen [12]. Und während eine operative Reduktion der viszeralen Fettmasse mit einer Verbesserung des metabolischen Risikoprofils einhergeht, ist dies bei einer Verminderung der subkutanen Fettmasse nicht nachweisbar [13, 14]. Daher wird zur Abschätzung des Risikos für metabolische und kardiovaskuläre Komplikationen auch die Menge des viszeralen Fettgewebes miteinbezogen. Hierfür wird als Näherung der Bauchumfang gemessen bzw. das Verhältniss von Bauch- zu Hüftumfang (WHR, *Waist To Hip Ratio*) bestimmt [6]. Der Bauchumfang sollte bei Männern unter 102 cm und bei Frauen unter 88 cm bzw. die WHR bei Männern unter 1,0 und bei Frauen unter 0,85 liegen. Werte darüber deuten auf eine vermehrte Menge viszeralen Fettgewebes hin, auch viszerale, abdominale oder zentrale Adipositas genannt.

1.2 Das Fettgewebe

1.2.1 Aufbau und Funktion des Fettgewebes

Das Fettgewebe umfasst zwei funktionell unterschiedliche Gewebe, das braune und das weiße Fettgewebe. Im Menschen spielt das braune Fettgewebe vor allem bei Neugeborenen eine Rolle in der Regulation der Körpertemperatur, während beim Erwachsenen überwiegend weißes Fettgewebe zu finden ist. Neben seiner Funktion als wichtigstes Energiespeicherorgan schützt das weiße Fettgewebe die inneren Organe vor mechanischem Stress und vor Auskühlung. Dabei stellt das Fettgewebe ein sehr heterogenes Organ dar, das in vielen Depots über den gesamten Körper verteilt ist. Neben dem subkutanen Fettgewebe und dem viszeralen Fettgewebe, welches das mesenteriale, omentale und retroperitoneale Fettgewebe einschließt, findet sich auch intrathorakales Fettgewebe sowie Anhäufungen von Adipozyten in bzw. um andere Organe wie Muskeln und Lymphknoten [7, 15, 16]. Das Fettgewebe setzt sich zudem aus einer Fülle verschiedener Zellen zusammen. Neben reifen Adipozyten finden sich im Fettgewebe auch Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Muskelzellen, mesenchymale Stammzellen und Makrophagen, welche in ihrer Gesamtheit als stromavaskuläre Zellen bezeichnet werden. Die Menge dieser Zellen ist sehr variabel und kann bis zu 50% der Zellen im Fettgewebe betragen [15, 17].

1.2.2 Die Rolle des Fettgewebes als endokrines Organ

Neben dem mechanischen Schutz anderer Organe und der Speicherung und Mobilisierung von Energie in Form von Triglyzeriden ist seit einigen Jahren auch eine endokrine Funktion des Fettgewebes bekannt [4]. Als endokrines Organ synthetisiert und sezerniert das Fettgewebe eine Reihe von physiologisch aktiven Substanzen, Adipozytokine genannt, welche systemische Prozesse wie Nahrungsaufnahme, Lipid- und Glukosestoffwechsel, Hämostase, Blutdruck, Entzündung und Angiogenese beeinflussen [15, 18]. Adipozytokine können sowohl von den Adipozyten als auch von den stromavaskulären Zellen des Fettgewebes exprimiert werden, wobei die Expression nicht auf das Fettgewebe beschränkt sein muss. Neben den peripheren Effekten, die diese Proteine ausüben, können Adipozytokine auch autokrin und parakrin auf Zellen des Fettgewebes selbst wirken [17, 19]. Adipozytokine sind direkt mit der Entstehung Adipositas assoziierter Erkrankungen verbunden und werden vom subkutanen und viszeralen Fettgewebe als zwei funktionell verschiedene Gewebe in unterschiedlichem Ausmaß synthetisiert [5]. Da primär die Zunahme des viszeralen Fettgewebes mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko einhergeht,

sind die physiologischen Eigenheiten der Adipozyten dieses Fettdepots von besonderem Interesse [20].

1.2.3 Adipozytokine in der Adipositas

Mit zunehmender Fettgewebsmasse steigt die Serumkonzentration der Adipozytokine an. Eine Ausnahmestellung nimmt in dieser Hinsicht Adiponektin ein, dessen Konzentration im Serum mit steigender Körperfettmasse abnimmt [21]. Die Expression von Adiponektin ist im viszeralen Fettgewebe höher als im subkutanen [19]. Adiponektin wird während der Adipozytenreifung durch *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR γ) induziert und von reifen Adipozyten konstitutiv sezerniert [22]. Mengenmäßig ist Adiponektin das bedeutsamste Sezernierungsprodukt des Fettgewebes und stellt mit Konzentrationen von 3 bis 30 $\mu\text{g/ml}$ etwa 0,01% des Gesamtproteins im Serum [21, 23]. Der Serumspiegel von Adiponektin ist in Patienten mit Adipositas, Metabolischem Syndrom, Insulinrestistenz, Typ 2 Diabetes mellitus, koronaren Herzerkrankungen, hepatischer Steatose, NASH und verschiedenen Tumoren teilweise unabhängig vom BMI erniedrigt und korreliert positiv mit HDL-Cholesterin und negativ mit Leptin, Insulin, Triglyzeriden, LDL-Cholesterin (LDL, *Low Density Lipoprotein*) und dem Nüchternblutzucker [24-26]. Adiponektin zirkuliert im Plasma als Trimer (LMW, *Low Molecular Weight*), Hexamer (MMW, *Medium Molecular Weight*) und 12- bis 18-mer (HMW, *High-Molecular Weight*), wobei den verschiedenen Isoformen eine unterschiedliche biologische Aktivität zugeschrieben wird. Adiponektin übt seine Effekte über zwei Rezeptoren aus, Adiponektin Rezeptor 1 (AdipoR1) und Adiponektin Rezeptor 2 (AdipoR2) [27, 28]. Adiponektin nimmt über das zentrale Nervensystem Einfluss auf die Nahrungsaufnahme, induziert die Freisetzung von Insulin aus dem Pankreas und verbessert in den peripheren Geweben die Insulinsensitivität [18, 29, 30]. So stimuliert Adiponektin im Skelettmuskel und in der Leber die Glukoseaufnahme und die Fettsäureoxidation [31-33]. Die einhergehende verringerte ektopische Triglyzeridmenge in diesen Geweben verbessert die Insulinsensitivität [34]. Zudem hemmt Adiponektin in der Leber die Glukoneogenese und die Fettsäuresynthese, wodurch der Blutzuckerspiegel sinkt und die Menge der Triglyzeride in der Leber und die Freisetzung von triglyzeridreichem *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) abnimmt [35, 36]. Die insulinsensitivierende Wirkung von Adiponektin wird hierbei durch Aktivierung von *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha* (PPAR α) und *Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase*

(AMPK) vermittelt [37]. Des Weiteren besitzt Adiponektin auch antiinflammatorische und antiatherogene Wirkung [38].

Leptin wurde 1994 als erstes Adipozytokin identifiziert und wird überwiegend von Adipozyten des subkutanen Fettgewebes in direkter Relation zur Menge der Körperfettgewebssmasse sezerniert [4, 19]. Adipositas ist von einer erhöhten Menge an zirkulierendem Leptin, aber auch von einer Leptinresistenz gekennzeichnet [39]. Leptin übt seine Wirkung über die Aktivierung seines gleichnamigen Rezeptors aus und reprimiert die Nahrungsaufnahme, fördert den Energieverbrauch, stimuliert die Fettsäureoxidation in Leber und Skelettmuskel und beeinflusst die hepatische Glukoneogenese und die Funktion der pankreatischen β -Zelle. Diese Effekte können von Leptin direkt in den peripheren Geweben ausgeübt werden. Seine größte Wirkung entfaltet Leptin jedoch durch die Modulation zentraler Regelkreise im Hypothalamus [18].

Eine vermehrte Fettgewebssmasse führt zu einer erhöhten Rekrutierung von Blutmonozyten in das Fettgewebe, die dort zu Makrophagen differenzieren und proinflammatorische Proteine sezernieren [40, 41]. Resistin wird von Makrophagen exprimiert und stärker vom viszeralen als vom subkutanen Fettgewebe sezerniert [42]. Obwohl im Tiermodell eine Rolle von Resistin in der Vermittlung der Insulinresistenz im Skelettmuskel und in der Leber nachgewiesen wurde, sind die Daten zur Rolle von Resistin im Glukosestoffwechsel im Menschen bislang nicht eindeutig [4]. Allerdings ist in Probanden mit Adipositas, Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes mellitus und verschiedenen mit einer Entzündung einhergehenden Krankheiten der Resistin Serumspiegel erhöht und korreliert mit einer Reihe von Entzündungsmarkern wie *C-Reactive Protein* (CRP) und Interleukin 6 (IL-6). Resistin könnte daher eine Verbindung zwischen chronischen Entzündungen und damit verbundenen metabolischen Veränderungen wie einer Insulinresistenz darstellen [18].

Die proinflammatorischen Zytokine *Tumour Necrosis Factor alpha* (TNF α) und IL-6 induzieren eine Insulinresistenz im Skelettmuskel und in der Leber, inhibieren die Adipogenese und reprimieren die Expression von Adiponektin [18]. Beide Zytokine werden sowohl von Adipozyten als auch von stromavaskulären Zellen des Fettgewebes exprimiert, wobei bei TNF α kein Unterschied in der Sekretion zwischen den Fettdepots vorliegt und IL-6 zwei- bis dreimal stärker vom viszeralen Fettgewebe sezerniert wird [5, 19]. Die Expression von TNF α und IL-6 im Fettgewebe korreliert positiv mit Adipositas und Insulinresistenz [4] (Abbildung 1).

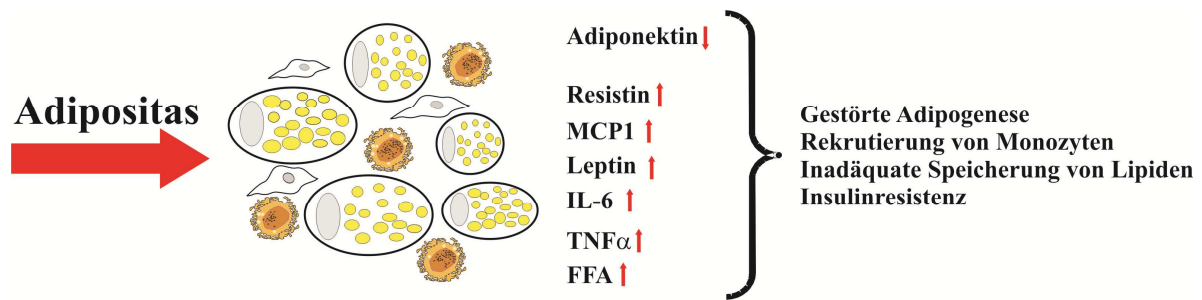


Abbildung 1: Schematische Darstellung der veränderten Adipozytokinfreisetzung in der Adipositas und deren Effekte. (MCP1, *Monocyte Chemoattractant Protein 1*; IL-6, Interleukin 6; TNF α , *Tumour Necrosis Factor alpha*; FFA, *Free Fatty Acid*, freie Fettsäure)

1.2.4 Die Rolle des viszeralen Fettgewebes in der Adipositas

Die Zunahme der Fettgewebsmasse in der Adipositas führt zu Veränderungen der endokrinen, autokrinen und parakrinen Funktion sowie der Zellzusammensetzung und der Genexpression des Fettgewebes [17]. Obwohl das viszerale Fettgewebe bei Männern mit ca. 20% und bei Frauen mit ca. 6% nur einen geringen Anteil der Gesamtkörperfettmasse ausmacht, trägt insbesondere die Zunahme dieses Fettdepots zum erhöhten Gesundheitsrisiko bei der Adipositas bei. Dieser Umstand wird auf einige spezifische Eigenschaften dieses Fettdepots zurückgeführt [5, 43].

1.2.4.1 Die Rolle des viszeralen Fettgewebes in der Insulinresistenz

Als entscheidend wird seit einigen Jahren die anatomische Lokalisation des viszeralen Fettgewebes angesehen. Die aufgestellte Hypothese, das *Portal Paradigm*, besagt, dass durch die direkte Sekretion des viszeralen Fettgewebes in die Pfortader die Leber deutlich höheren Konzentrationen der durch dieses Fettdepot freigesetzten Substanzen ausgesetzt ist als andere Organe im Körper und das viszerale Fettgewebe dadurch direkt und wesentlich zur hepatischen und systemischen Insulinresistenz beitragen kann [5].

So weist das viszerale Fettgewebe auf Grund eines verminderten Ansprechens auf die antilipolytische Wirkung von Insulin und einem vermehrten Ansprechen auf die Lipolyseinduzierende Wirkung von Katecholaminen eine höhere Lipolyserate auf und setzt daher vermehrt freie Fettsäuren (FFA, *Free Fatty Acids*) frei, die über die Pfortader direkt in die Leber gelangen. Während bei normalgewichtigen Personen der Anteil der vom viszeralen Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren an der Gesamtmenge in der Pfortader bei ca.

5% liegt, kann bei adipösen Personen der Beitrag des viszeralen Fettgewebes auf über 30% ansteigen [44]. In der Leber werden die freien Fettsäuren entweder als Triglyzeride gespeichert oder über VLDL wieder in die Zirkulation abgegeben, welches sekundär eine Erhöhung des LDL und eine Erniedrigung des HDL zur Folge hat [45]. Die vermehrte Speicherung von Triglyzeriden in der Leber führt einerseits zu einer Insulinresistenz und andererseits zu einem verminderten Abbau von Insulin, wodurch die vorhandene Hyperinsulinämie weiter verstärkt wird. Die erhöhten Mengen Insulin sind trotz der hepatischen Insulinresistenz in der Lage die Synthese von freien Fettsäuren in der Leber zu stimulieren und den Abbau der Fettsäuren in der β -Oxidation zu unterdrücken. Diese Vorgänge fördern die Entstehung einer hepatischen Steatose und einer NASH [8, 45]. Zudem exprimiert und sezerniert das viszerale Fettgewebe ein distinktes Adipozytokinmuster. Im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe, dessen Sekretion von Adiponektin in der Adipositas abnimmt, sezerniert das viszerale Fettgewebe in der Adipositas z.B. vermehrte Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, welches die Insulinresistenz durch die Induktion von *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) fördert [46]. IL-6 erhöht auch die hepatische Synthese von CRP, welches die niedriggradige systemische Entzündung und den vermehrten oxidativen Stress erklären könnte [45, 47-49]. Zudem könnte dies zu Entzündung, Fibrose und Nekrose in der Leber beitragen, welche den Übergang von einer Fettleber zu einer Leberfibrose und einer Leberzirrhose kennzeichnen [45]. Bislang liegen nur wenige Daten über den Beitrag des viszeralen Fettgewebes zu systemischen Konzentrationen verschiedener Adipozytokine vor, da die Pfortader für eine Blutentnahme nicht leicht zugänglich ist. Vor kurzem konnte jedoch von einer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in adipösen Probanden die Konzentration von IL-6 in der Pfortader etwa um 50 Prozent erhöht war im Vergleich zur systemischen Konzentration. Diese Daten stützen die oben genannte Pfortaderhypothese [50] (Abbildung 2).

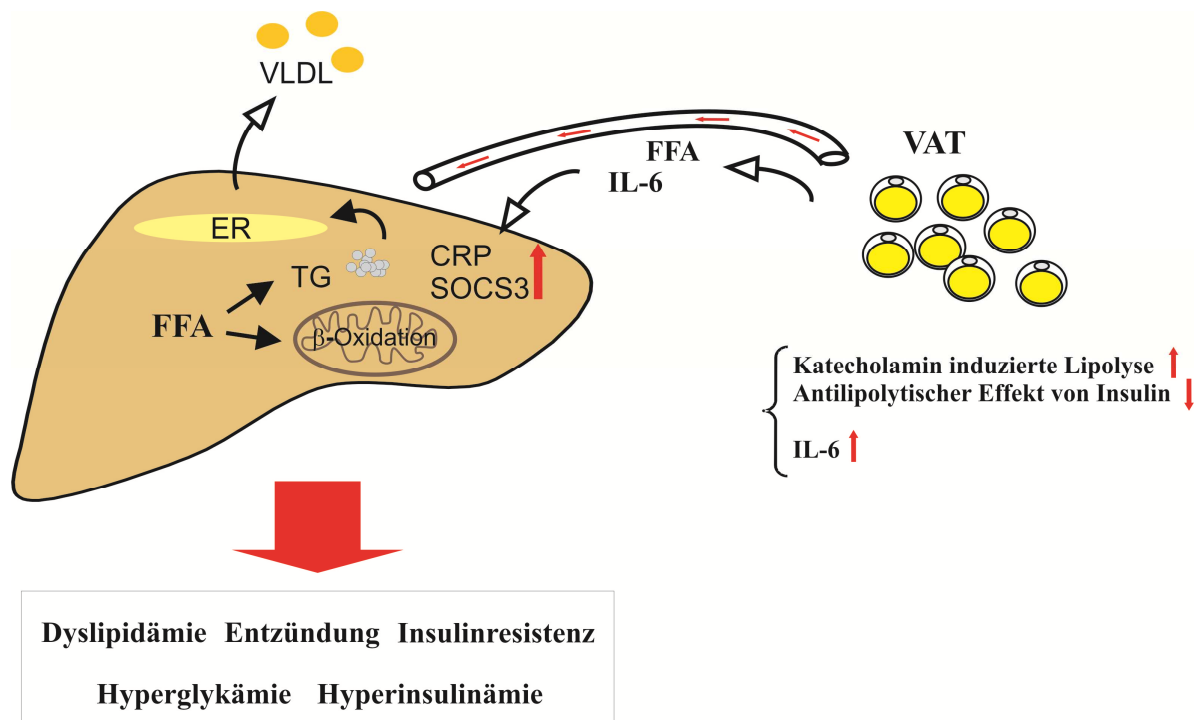


Abbildung 2: Charakteristika des viszeralen Fettgewebes (VAT, *Visceral Adipose Tissue*), die zur hepatischen Insulinresistenz und damit assoziierten Ausprägungen des metabolischen Syndroms beitragen. (IL-6, Interleukin 6; FFA, *Free Fatty Acid*, freie Fettsäure; CRP, *C-Reactive Protein*, TG, Triglyzerid; SOCS3, *Suppressor of Cytokine Signaling 3*; ER, Endoplasmatisches Retikulum)

1.2.4.2 Die Rolle des viszeralen Fettgewebes in der Entzündung

Proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-6 und Chemokine wie *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP1) werden zunehmend für die Pathogenese des metabolischen Syndroms verantwortlich gemacht. Adipositas und Adipositas assoziierte Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes werden von einer leichten chronischen Entzündung begleitet, und umgekehrt gehen inflammatorische Krankheiten oft mit einer Insulinresistenz einher [17, 51]. Untersuchungen der Genexpression des Fettgewebes in der Adipositas zeigen, dass etwa 30% der mit dem BMI korrelierenden Gene für Entzündungs- und Makrophagenspezifische Produkte kodieren [40, 52]. Diese werden maßgeblich von Makrophagen sezerniert, die in Abhängigkeit des Grads der Adipositas als Monozyten aus dem Blut in das Fettgewebe einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren [40, 52, 53]. Der Anteil der Makrophagen an der Zellmasse der Fettgewebes ist sehr variabel und kann auf über 50% ansteigen [40, 53]. Das viszerale Fettgewebe weist hierbei in der Adipositas einen höheren Anteil an Makrophagen auf als das subkutane [54]. Dies verdeutlicht die erhebliche Plastizität des Fettgewebes. Auffallend sind die ähnlichen

Eigenschaften und Expressionsmuster, die Makrophagen und Adipozyten im Fettgewebe in der Adipositas aufweisen. Die Reifung beider Zelltypen wird durch PPAR γ reguliert, sowohl Adipozyten als auch Makrophagen sind in der Lage Lipide einzulagern und Adipozyten sezernieren, insbesondere in der Adipositas, eine Reihe von makrophagen-spezifischen Proteinen wie MCP1 und *Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha* (MIP1 α), welche wiederum chemotaktisch wirken und weitere Monozyten rekrutieren [17, 55, 56]. Andererseits wirken Produkte der Makrophagen wie TNF α auf die Adipozyten, hemmen die Adipogenese, mindern die Insulinsensitivität, fördern die Lipolyse und stimulieren die Apoptose der Adipozyten [17]. Somit ergibt sich eine Wechselwirkung zwischen den Adipozyten und den Makrophagen im Fettgewebe: Sezernierungsprodukte der Makrophagen induzieren in den Adipozyten Insulinresistenz und Entzündung, was zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch die Adipozyten und zur Rekrutierung weiterer Monozyten führt [49, 57].

Die erhöhten Glukose- und Lipidkonzentrationen im Serum in der Adipositas spielen eine Rolle bei der Entstehung der chronischen Entzündung. Untersuchungen zeigen, dass diese Bedingungen in den Adipozyten und Makrophagen zu erhöhten Lipidmengen, zu Stress im endoplasmatischen Retikulum durch die Kapazitätsüberlastung und zur verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen in den Mitochondrien durch den Glukoseabbau und die β -Oxidation führen, und dass dadurch eine Aktivierung der *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) und der *Inhibitor of NF- κ B Kinase* (IKK) induziert wird. Die Aktivierung von JNK und IKK hemmt die Wirkung von Insulin durch eine Blockade des Insulinsignalwegs und führt unter anderem zur Expression proinflammatorischer Zytokine [47, 58].

1.3 Medikamente zur Verbesserung der Insulinresistenz

Da die abdominale Adipositas der Parameter ist, der am stärksten mit metabolischen und kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist und diesen vorangeht, stellt eine Gewichtsreduzierung im Zuge einer Ernährungsumstellung und erhöhter physischer Aktivität bislang die beste therapeutische Option für Patienten mit einem Metabolischen Syndrom dar. Bereits eine geringe Gewichtsreduktion geht mit einer Verringerung der viszeralen Fettmasse und einer Verbesserung aller mit dem Metabolischen Syndrom assoziierten metabolischen Störungen einher [59]. Daneben können verschiedene operative Eingriffe sowie Medikamente zur Behandlung einzelner Risikofaktoren unterstützend

wirken. Hierbei steht die medikamentöse Behandlung der Insulinresistenz im Vordergrund [1-3].

Für die Behandlung von Patienten mit einem Metabolischen Syndrom steht eine Reihe von insulinsensitivierenden Medikamenten zur Verfügung, die an unterschiedlichen Stellen in den Stoffwechsel eingreifen. Das Biguanid Metformin aktiviert die AMPK, was zum einen zur Hemmung der Glukoneogenese in der Leber und zum anderen durch Induktion der β -Oxidation zum Abbau von Fettsäuren in peripheren Geweben führt [60]. Fibrate, wie z.B. Fenofibrat, werden hingegen als Lipidsenker eingesetzt. Sie erhöhen als Agonisten von PPAR α die Fettsäureoxidation und führen ebenfalls zur Verbesserung der Insulinsensitivität in den peripheren Organen [61]. Thiazolidinedione wiederum, zu welchen auch Pioglitazon gehört, üben ihre insulinsensitivierende Wirkung durch Aktivierung des für die Adipogenese essentiellen Transkriptionsfaktors PPAR γ aus, der die Differenzierung von Adipozyten fördert und die Einlagerung von Triglyzeriden in das Fettgewebe fördert [62, 63]. Die damit einhergehende verringerte ektopische Triglyzerideinlagerung in den peripheren Geweben erhöht dort die Insulinsensitivität [34]. Des Weiteren führt die Aktivierung von PPAR γ in Makrophagen zur Ausbildung eines M2 Phänotyps, der mit verminderten inflammatorischen Eigenschaften dieser Zellen verbunden ist [56].

1.3.1 Metabolische Effekte von Metformin

Metformin ist seit über 50 Jahren eines der am häufigsten eingesetzten Medikamente zur Behandlung von Typ 2 Diabetes mellitus und führt zu einer signifikanten Reduktion der kardiovaskulären Mortalität bei diesen Patienten [60, 64]. Metformin übt seine Effekte überwiegend über die Aktivierung der AMPK aus. Die AMPK ist einer der Hauptregulatoren des Energiehaushalts, sowohl auf zellulärer als auch auf systemischer Ebene. Sie schaltet den Stoffwechsel vom anabolischen Zustand der Nährstoffaufnahme und –speicherung in den katabolischen Zustand des Nährstoffabbaus um [65]. Die Aktivität der AMPK wird über das zytosolische Verhältnis von AMP zu ATP gesteuert. Steigt die Konzentration von AMP in der Zelle an, inhibiert die AMPK durch Reprimierung der Transkriptionsfaktoren *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (SREBP-1c) und *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (ChREBP) und der Enzyme Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und der HMG-CoA-Reduktase die Fettsäure- und Cholesterinsynthese und induziert die β -Oxidation. Gleichzeitig hemmt sie durch eine Reprimierung der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) und der Glukose-6-Phosphatase die

endogene Glukoneogenese in der Leber [66, 67]. Diese Vorgänge führen durch den Abbau intrazellulärer Fettsäuren einerseits zu einer höheren Sensitivität der Zelle gegenüber Insulin und andererseits zu einer Reduktion der Plasma Glukose und der Plasma Triglyzeride [60]. Allerdings aktiviert Metformin nicht direkt die AMPK, sondern hebt wie die Thiazolidinedione durch Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung die Menge an AMP in der Zelle an [65]. Zu den endogenen Aktivatoren der AMPK in Leber und Muskel zählt zudem Adiponektin [68, 69]. Nachgewiesene Effekte von Metformin auf Fettgewebe und Adipozyten sind rar. Metformin scheint keinen Einfluss auf die Synthese von Adiponektin zu haben [70]. Allerdings reduziert Metformin die Katecholamininduzierte Lipolyse in Adipozyten, was zur Reduktion der zirkulierenden Fettsäuren und Verbesserung der Insulinsensitivität beitragen könnte [71].

1.3.2 Metabolische Effekte von Fenofibrat

Fibrate, wie z.B. Fenofibrat, üben ihre Wirkung durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR α aus, zu dessen natürlichen Agonisten Fettsäuren zählen. PPAR α wird sehr stark in der Leber exprimiert sowie im geringeren Umfang im Fettgewebe und im Muskel [72]. Eine Behandlung mit Fibraten führt bei Patienten mit einem Metabolischen Syndrom oder Typ 2 Diabetes, v.a. bei Vorliegen einer Adipositas und einer atherogenen Dyslipidämie, zu einer signifikanten Reduktion des kardiovaskulären Risikos [61]. Eine Aktivierung von PPAR α durch Fibrate stimuliert den Abbau von Fettsäuren durch β -Oxidation in der Leber und bewirkt eine erhöhte Expression der Lipoprotein Lipase (LPL) und von Apolipoprotein AV (ApoAV), einem LPL Aktivator, wodurch es zu einem vermehrtem Abbau triglyzeridreicher Lipoproteine kommt. Beide Vorgänge führen zu einer Senkung der Plasma Triglyzeride. Des Weiteren wird die Expression der HDL Apolipoproteine ApoAI und ApoAII und des am reversen Cholesterintransport beteiligten Transporters *ATP Binding Cassette Transporter1* (ABCAI) induziert, womit eine Erhöhung des HDL-Cholesterins verbunden ist. Daneben geht die Aktivierung von PPAR α auch mit antiinflammatorischen Effekten einher, da über die Hemmung der Signaltransduktionswege von *Nuclear Factor kappa B* (NF κ B) und *Activator Protein 1* (AP-1) u.a. die Synthese von TNF- α und IL-6 verringert und infolgedessen auch die IL-6 induzierte Synthese von CRP in der Leber reduziert wird [61, 73].

Im Fettgewebe wurde nach Fenofibratgabe eine erhöhte Freisetzung von Adiponektin und eine verminderte Sekretion von *Plasminogen Aktivator Inhibitor Type 1* (PAI-1) und

Retinol-Binding Protein-4 (RBP4) durch die Adipozyten, eine Abnahme der Adipozytengröße, sowie eine Induktion der Mitochondrienbiogenese und der Fettsäureoxidation beobachtet [74-79]. Der damit verbundene geringere Fettsäureefflux könnte ebenso wie die verminderte Expression von TNF- α , MCP-1 und IL-6 zu einer verminderten proinflammatorischen Antwort der stromavaskulären Zellen, insbesondere der Gewebsmakrophagen, führen [76, 80]. Auch wurde im Tiermodell eine Abnahme des viszeralen Fettgewebes und ein Schutz vor einer Lebersteatose mit Fenofibrat nachgewiesen [81, 82].

1.3.3 Metabolische Effekte von Glitazonen

Rosiglitazon und Pioglitazon gehören zur Wirkstoffklasse der Glitazone, auch Thiazolidinedione genannt, und aktivieren als direkte Agonisten den nukleären Hormonrezeptor PPAR γ [83]. PPAR γ wird sehr stark im Fettgewebe und etwas schwächer in der Leber und im Muskel exprimiert und ist ein für die Adipogenese essentieller Transkriptionsfaktor, der die Expression von Proteinen zur Aufnahme und Oxidation von Fettsäuren induziert [84]. Eine Behandlung mit Rosiglitazon vermindert das Risiko für die Ausprägung eines Typ 2 Diabetes in Personen mit einer Glukoseintoleranz [85]. Gleichzeitig führt eine Behandlung mit Glitazonen aber auch zu einer geringen Gewichtszunahme, da die Aktivierung von PPAR γ durch Glitazone eine vermehrte Speicherung von Triglyzeriden im Fettgewebe bewirkt. Dies ist auf eine Zunahme der Adipozytenzahl, Hyperplasia genannt, und nicht auf eine Zunahme der Adipozytengröße, Hypertrophie genannt, zurückzuführen [86-88]. Dieser langfristige Effekt ist nur im subkutanen und nicht im viszeralen Fettgewebe zu beobachten. Es kommt somit zu einer Veränderung der Fettgewebsverteilung im Körper [89, 90]. Sekundär wird dadurch die systemische Insulinsensitivität verbessert, da weniger Fettsäuren ektopisch in Leber und Muskel gespeichert werden [91, 92]. Im Muskel bewirkt eine Aktivierung von PPAR γ durch Glitazone zudem eine vermehrte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4). Dies führt zur vermehrten Aufnahme von Glukose durch die Muskulatur und einer Senkung des Blutzuckerspiegels [93]. Weitere Effekte der Glitazone sind eine Senkung der Plasma Triglyzeride, des HbA1c, der freien Fettsäuren, eine Abnahme des systemischen TNF α und Leptins und eine Erhöhung des HDL-Cholesterins [93, 94].

Im Fettgewebe induzieren Glitazone zudem die Synthese und Freisetzung von Adiponektin, insbesondere der hochmolekularen Form. Dessen Zunahme korreliert stark mit der bei

Glitazongabe beobachteten Reduktion der endogenen hepatischen Glukoseproduktion und der Verbesserung der hepatischen Insulinsensitivität und könnte durch Aktivierung der AMPK in der Leber für die protektive Wirkung der Glitazone verantwortlich sein [87, 94-96]. Des Weiteren wird eine verminderte Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe beschrieben, die auf eine reduzierte Freisetzung des Chemokins MCP1 und der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 in Monozyten und Makrophagen durch Inhibierung von AP-1, STAT1 und NF κ B zurückzuführen sein dürfte, da eine Stimulation von PPAR γ durch Glitazone in Makrophagen die Ausbildung eines sogenannten alternativ aktivierten M2 Phänotyps bewirkt [56, 84, 97, 98].

1.4 Aldehydoxidase 1

Das Enzym Aldehydoxidase 1 (AOX1) gehört zur Familie der Molybdän-Flavoproteine und katalysiert die Oxidation verschiedener Aldehyde und N-heterozyklischer Xenobiotika [99]. Obwohl die AOX1 auf Grund ihrer starken Expression in der Leber und im Zusammenhang mit der Umsetzung verschiedener Medikamente pharmakokinetisch intensiv untersucht wurde, sind ihre natürlichen Substrate und ihre physiologische Rolle bislang unbekannt [100-102]. Da als Nebenprodukt bei den von der AOX1 katalysierten Oxidationsreaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*) freigesetzt werden, könnte die AOX1 jedoch signifikant zur endogenen ROS Produktion beitragen [103]. ROS sind nachweislich an der Pathogenese der Adipositas assoziierten Insulinresistenz wie auch an einer verminderten Adipogenese und einer verringerten Lipideinlagerung im weißen Fettgewebe beteiligt und reduzieren die Freisetzung von Adiponektin [21, 45, 104]. Vor einigen Jahren wurde in Genexpressionsanalysen des subkutanen und des viszeralen Fettgewebes nicht diabetischer, adipöser Männer eine höhere Expression der AOX1 im viszeralen Fettgewebe beschrieben, eine Expression des Proteins im Fettgewebe oder in Adipozyten wurde jedoch noch nicht analysiert [105].

1.5 Superoxid-Dismutase 2

Superoxid-Dismutase 2 (MnSOD, SOD2) gehört zur ubiquitären Familie der Superoxid-Dismutasen, die die Disproportionierung von Superoxid-Anionen katalysieren. SOD2 ist eine der drei in Säugern vorkommenden Superoxid-Dismutasen. Das homotetramere Enzym enthält Mangan als Kofaktor und liegt in der mitochondrialen Matrix vor, wo es dem Schutz vor Sauerstoffradikalen dient, die im großen Umfang als natürliches Nebenprodukt bei der

oxidativen Phosphorylierung entstehen [106]. Die physiologische Relevanz dieses Enzyms wird in transgenen Mausmodellen deutlich: SOD2 Defizienz führt bedingt durch den mitochondrialen oxidativen Stress innerhalb weniger Tage nach der Geburt zum Tod der Tiere [107-109]. Die Menge an ROS in der Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und unterliegt einer strikten Kontrolle. Ein Übermaß an ROS vermindert so z.B. die insulinstimulierte Glukoseaufnahme und fördert die Differenzierung von Muskelstammzellen und Knochenmarkstromazellen zu Adipozyten [110-112]. Als antioxidatives Enzym könnte die SOD2 daher eine wichtige Rolle bei der Adipogenese und der Insulinsensitivität spielen und von Bedeutung für das Metabolische Syndrom sein.

1.6 Annexin A6

Annexin A6 ist ein 67 kDa Protein und gehört zur Familie der Annexine. Diese Proteine besitzen eine konservierte C-terminale Domäne, welche die Bindung von Kalziumionen (Ca^{2+}) und Phospholipiden ermöglicht. Annexine vermitteln in einer Ca^{2+} bzw. pH abhängigen Reaktion u.a. Membran-Membran- sowie Membran-Zytoskelett-Interaktionen und sind an Vesikeltransport, Zellteilung, Apoptose, Kalziumsignaltransduktion und Regulation des Zellwachstums beteiligt [113]. Annexine liegen unter unstimulierten Bedingungen im Zytosol verteilt vor und können in einer Ca^{2+} bzw. pH abhängigen Reaktion an definierte Membrankompartimente in der Zelle binden, wie etwa an die Zytoplasmamembran oder an Endosomen. Zusätzlich sind sie in der Lage andere Proteine zu binden und können so in einer regulierten Aktion Proteine zu bestimmten Zellkompartimenten transportieren [113]. Eine veränderte Expression von Annexinen wurde in verschiedenen Krankheiten nachgewiesen, u.a. im Diabetes [114]. So wurde eine Beteiligung von Annexin A2 an der insulinabhängigen Rekrutierung von GLUT4 Vesikeln zur Zytoplasmamembran beschrieben [115]. Zudem wurde für Annexin A1 eine Rolle in der Lipolyse und eine differenzielle Expression während der Adipogenese gezeigt [116, 117]. Vohl und Kollegen beschrieben in Genexpressionsanalysen des subkutanen und des viszeralen Fettgewebes eine differenzielle Expression von Annexin A2, Annexin A3, Annexin A5 und Annexin A8 [105]. Für Annexin A6 liegen hierzu keine Daten vor. Allerdings wurde eine Regulation von Annexin A6 im Zusammenhang mit der Adipozytengröße gefunden sowie eine Beteiligung am reversen Cholesterintransport [118, 119]. In unserer Arbeitsgruppe konnte zudem eine verminderte Expression von Annexin A6

in den peripheren Blutmonozyten von adipösen Personen und Typ 2 Diabetikern nachgewiesen werden [120].

1.7 Omentin

Omentin wurde 2006 erstmals als ein neues Adipozytokin, welches spezifisch vom omentalen Fettgewebe exprimiert und sezerniert wird, identifiziert [121]. Zuvor wurde Omentin bereits unter den Namen Intelectin 1, HL-1 und Lactoferrinrezeptor als humanes Homolog des in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimierten Lectins XL35 beschrieben [122-124]. Von diesen Gruppen wurde Omentin zum einen als intestinales Lactoferrinbindendes Protein nachgewiesen, welches an einer Rezeptor vermittelte Nährstoffaufnahme in Neugeborenen beteiligt ist, und zum anderen als Galaktofuranosylgruppenbindendes endotheliales Lectin, welches Kalziumabhängig bakterienspezifische Komponenten binden kann [122-124]. In seiner letzteren Funktion dient Omentin im Dünndarm wahrscheinlich dem Schutz der Darmmukosa, indem es mögliche Bindestellen von Mikroorganismen im Darmepithel verdeckt, und ist somit wie das zu 83% in der Aminosäuresequenz übereinstimmende Omentin 2 (Intelectin 2, HL-2) ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort [125-127]. In einer jüngeren Arbeit wurde zudem eine Verbesserung der Phagozytose von Mikroorganismen durch Makrophagen in Abhängigkeit von Omentin gezeigt [128].

Im humanen Fettgewebe erfolgt die Synthese des Proteins ausschließlich von den stromavaskulären Zellen und nicht von den Adipozyten, und ist zudem im subkutanen Fettgewebe im Vergleich zum viszeralen Fettgewebe kaum nachweisbar [121]. Im humanen Serum wurde Omentin u.a. von unserer Arbeitsgruppe detektiert und liegt dort in Konzentrationen von 150 bis 300 ng/ml vor [121, 129-131]. Bereits vor einigen Jahren wurde von mehreren Arbeitsgruppen das Vorliegen von Omentin in mehreren Isoformen gezeigt: als 34 kDa großes Monomer und als 136 kDa großes Trimer [122-124]. Für die Plasmakonzentration von Omentin konnte u.a. eine negative Korrelation zum BMI, zur WHR und den Serumspiegeln von Insulin, Glukose und Leptin sowie eine positive Korrelation zu HDL- und Adiponektin Serumspiegeln gezeigt werden [130, 131]. Omentin ist im Serum von Frauen höher und niedriger im Serum von adipösen und von insulinresistenten Personen [130, 131]. Des Weiteren wurde eine verminderte Serumkonzentration bei Typ 1 Diabetikern und eine niedrigere Expression in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn und Asthma beschrieben [132-135]. Im

Aszites zeigt Omentin nicht nur eine Korrelation zum BMI und zur Serumkonzentration, sondern auch zum Grad der lokalen und systemischen Entzündung [136]. Zudem wird eine Induktion des Omentinserumspiegel im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen erwähnt [137, 138].

In vitro verstärkt rekombinantes Omentin die insulininduzierte Glukoseaufnahme in subkutanen und viszeralen Adipozyten und aktiviert auch unabhängig von Insulin die Protein Kinase B (AKT) [121]. Somit könnte Omentin ein neues insulinsensitivierendes Adipozytokin sein.

1.8 Galectin 3

Galectin 3 gehört zur Proteinfamilie der β -Galaktosidbindenden Lectine. Als einziges der bislang beschriebenen 15 Galectine in Säugern gehört Galectin 3 zum Chimäratyp und besitzt neben der für alle Galectine charakteristischen C-terminalen stark konservierten Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*) auch eine N-terminale Prolin- und Glyzinreiche Kollagenähnliche Domäne [139]. Während die CRD-Domäne die Bindung des bevorzugten Liganden N-Acetyllaktosamin vermittelt, spielt die N-terminale Domäne eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Galectin 3 Multimeren [139, 140]. Intrazellulär lässt sich Galectin 3 als 30 kDa großes Protein überwiegend im Zytosol nachweisen. In geringeren Mengen ist Galectin 3 jedoch auch im Zellkern zu finden [141, 142]. Daneben wird Galectin 3 über einen nicht klassischen Weg sezerniert, und kann im Extrazellulärraum, auf Zelloberflächen und im Serum nachgewiesen werden [139, 143]. Als ubiquitäres Protein wird Galectin 3 in zahlreichen Geweben und Zelltypen exprimiert [139]. In Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation und dem untersuchten Zelltyp wird für Galectin 3 eine Vielzahl von Funktionen beschrieben. So ist Galectin 3 u.a. im Extrazellulärraum an der Vermittlung von Zellmigration, Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktionen beteiligt [139, 143]. Intrazellulär wurde eine Rolle von Galectin 3 an der Regulation der Apoptose und der Prozessierung von prä- mRNA nachgewiesen [139, 144]. Galectin 3 wirkt als Chemoattraktant migrationsfördernd auf verschiedene Immunzellen und ist im Serum von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn und systemischer Lupus Erythematosus, und Karzinomen, wie Melanom und Leberzellkarzinom (HCC, *Hepatocellular Carcinoma*), erhöht [145-151]. Galectin 3 defiziente Mäuse weisen in verschiedenen Krankheitsmodellen zudem weniger

entzündliche Infiltrate in den betroffenen Geweben und eine geringere Freisetzung von TNF- α durch die infiltrierten Makrophagen auf [152-154].

Studien an Galectin 3 defizienten Mäusen zeigen zudem eine protektive Rolle für Galectin 3 in der Atherosklerose und im Diabetes [152, 153, 155]. Dies wird u.a. auf die durch Galectin 3 vermittelte Aufnahme von modifizierten *Low Density Lipoprotein* (LDL) und *Advanced Glycation End-Products* (AGE) zurückgeführt [156-158]. AGE entstehen durch eine spontane nicht enzymatische Glykation von Proteinen und sind u.a. an der Entstehung von Sekundärkomplikationen im Diabetes mellitus beteiligt [159, 160]. Galectin 3 defiziente Mäuse weisen erhöhte AGE Serumspiegel und vermehrte durch diese bedingte Gewebeschäden auf [158, 161]. Die erhöhten Mengen an AGE in den Galectin 3 defizienten Mäusen werden auch für die Entstehung der in diesen Tieren nachweisbaren nicht-alkoholischen Steatohepatitis verantwortlich gemacht, welche in einer Leberzirrhose und/oder in einem HCC enden kann [162, 163].

Eine Expression von Galectin 3 in Adipozyten und im Fettgewebe wurde 2007 erstmals durch Kiwaki und Kollegen beschrieben [164]. Sie konnten eine Zunahme der Galectin 3 Expression im epididymalen Fettgewebe von adipösen Mäusen sowie einen stimulatorischen Effekt von Galectin 3 auf die Proliferation von Präadipozyten zeigen.

1.9 Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1

Chemerin wurde 2007 von drei Arbeitsgruppen als neues Adipozytokin identifiziert [165-167]. Ursprünglich wurde für Chemerin, auch Tazarotene Induced Gene 2 (TIG2) oder Retinoic Acid Receptor Responder 2 (RARRES2) genannt, eine Induktion durch das synthetische Retinoid Tazarotene beschrieben [168]. Chemerin wird als 164 Aminosäuren große Präprochemerin synthetisiert und nach Abspaltung des Signalpeptids als 143 Aminosäuren langes Prochemerin sezerniert. Erst durch extrazelluläre Abspaltung eines sechs Aminosäuren großen C-terminalen Peptids durch Serinproteasen des Gerinnungs-, Fibrinolyse- bzw. Immunsystems wird das inaktive Prochemerin in das aktive 137 Aminosäuren große Chemerin überführt [169]. Chemerin gehört zu den Chemokinen und weitere Untersuchungen zeigten, dass aktives Chemerin der natürliche Ligand des G-Protein gekoppelten Rezeptors *Chemokine-Like Receptor 1* (CMKLR1) ist, welcher von Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert wird, und als Chemoattraktant die Migration von CMKLR1 exprimierenden Zellen des Immunsystems bewirkt [170-177]. Eine Aktivierung des Chemerinrezeptors CMKLR1 durch Chemerin führt zur Abnahme des

intrazellulären cAMP Spiegels, zur Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration und zur Phosphorylierung der *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) [174]. Neben dieser proinflammatorischen Funktion von Chemerin sind für die Spaltprodukte Chemerin-9 und Chemerin-15, welche ebenfalls an den Rezeptor CMKLR1 binden, auch antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben worden [178-180].

In C57BL/6 Mäusen und fetten Sandratten (*Psammomys obesus*) konnte eine Expression von Chemerin und CMKLR1 in verschiedenen Fettgewebsdepots nachgewiesen werden, die mit dem Grad der Adipositas zunahm [165-167]. Im Menschen ist Chemerin im subkutanen und omentalen Fettgewebe exprimiert und ist bei Frauen mit Polyzystischem Ovarsyndrom (PCOS, *Polycystic Ovary Syndrome*) in beiden Fettdepots stark induziert [181]. Eine Expression von Chemerin und CMKLR1 in Adipozyten konnte ebenso wie eine Sekretion von Chemerin durch Adipozyten und Fettgewebsexplante detektiert werden [165-167, 181]. Dies könnte eine autokrine bzw. parakrine Wirkung von Chemerin ermöglichen. Knock-down Experimente bestätigten zudem eine Rolle von Chemerin und CMKLR1 in der frühen Adipogenese und deuteten auf einen Einfluss von Chemerin auf die induzierte Lipolyse und die Insulinsignaltransduktion hin [166, 167, 182, 183]. Im Menschen korrelieren die Serumspiegel von Chemerin mit Markern des Metabolischen Syndroms wie BMI, Blutdruck, Insulinresistenz, HDL-Cholesterin, Triglyzeriden und Glukose und mit Entzündungsmarkern wie IL-6 und TNF- α [165, 184, 185]. Mit seiner Rolle im Glukose- und Lipidstoffwechsel sowie in der angeborenen und erworbenen Immunantwort könnte Chemerin als neues Adipozytokin somit von Bedeutung für das Metabolische Syndrom sein.

1.10 Ziel dieser Arbeit

Viszerales Fettgewebe ist ein wichtiger metabolischer und kardiovaskulärer Risikofaktor. Die erhöhte Lipolyserate des viszeralen Fettgewebes resultiert in einer erhöhten Zirkulation freier Fettsäuren im Blut, was zur vermehrten Speicherung von Triglyzeriden in der Leber und weiteren Organen führt und dort eine Insulinresistenz induzieren kann. Zugleich produziert das viszerale Fettgewebe Adipozytokine, die die periphere Insulinsensitivität beeinflussen.

In dieser Arbeit sollte die differentielle Genexpression in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes untersucht werden, um bisher nicht beschriebene Adipozytokine, die vermehrt vom viszeralem Fett synthetisiert werden, zu identifizieren. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob diese Proteine von Adipozyten oder Zellen der stromavaskulären Fraktion freigesetzt werden. Die so identifizierten Adipozytokine sollten näher charakterisiert und im Serum von schlanken und übergewichtigen gesunden Probanden und Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus gemessen werden. Dies sollte zeigen, ob eine Korrelation der Serumkonzentration zu Bauchumfang und/oder metabolischen Erkrankungen vorliegt.

Um die Funktion dieser Adipozytokine zu klären, sollte zudem die Wirkung der rekombinant exprimierten Proteine auf primäre humane Hepatozyten untersucht werden. Mit Hilfe von GeneChip Experimente sollten die Effekte der rekombinanten Proteine auf die globale Genexpression geklärt werden. Nach Auswertung dieser Daten sollten einige der als differentiell exprimiert identifizierten Kandidatengene mit Hilfe von Real-Time RT-PCR auf mRNA Ebene und anschließend auf Proteinebene verifiziert werden.

Aus diesen Untersuchungen wird ein weiteres Verständnis der Funktion von Adipozytokinen erwartet, die vermehrt vom viszeralen Fettgewebe freigesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Peqlab
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
CCD-Kamera	Rainbow
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2	Vacubrand
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Flüssigstickstoffanlage ESPACE 600	AIR LIQUIDE Karyotechnik
Geldokumentation	MWG-Biotech
Geltrockner	Biometra
Inkubationsschrank 27° Celsius	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank 37° Celsius, 5% CO ₂	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler® LC Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time RT-PCR Gerät LC2 mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Mikroskop DM IL und Zubehör	Leica
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-Q Biocell	Millipore
PCR Cycler T-Gradient Thermocycler	Biometra
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Schüttler 3013	GFL
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik
Schüttler Typ VX 2E	Janke und Kunkel
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
SDS-Gelplatten und Zubehör	Bio-Rad

Sicherheitswerkbank
 Speed-Vac Alpha RVC
 Sterilisator WTC
 Thermoblock TB 1
 Thermomixer Comfort
 Tischzentrifuge 5415C
 Tischzentrifuge 5424
 Tischzentrifuge Biofuge A
 Trans-Blot Cell Transferkammer
 Ultraschallgerät mit Power Supply
 UV/Vis Photometer Ultraspec 2000
 UV-Flächenstrahler TFX-20 M
 Vakuumpumpe
 Vortex VF2
 Wasserbad WPE 45
 X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)
 Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm
 Zentrifuge Biofuge Stratos
 Zentrifuge Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments
 Christ
 Binder
 Biometra
 Eppendorf
 Eppendorf
 Eppendorf
 Heraeus Instruments
 Bio-Rad
 Bandelin
 Pharmacia
 MWG-Biotech
 KNF Laboport
 Janke und Kunkel
 Memmert
 Siemens
 Neubauer
 Heraeus Instruments
 Heraeus Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)
 Dialyseschlauch (29 mm)
 EDTA Monovette Serumröhrchen
 ELISA-Platte (96 Loch)
 Gel Blotting Papier
 Hanndee™ Mini-Spin Säulchen
 Hyperfilm ECL™
 Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)
 Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)
 LightCycler® Kapillaren (20 µl)
 Parafilm
 Petrischalen (10 x 1,5 cm)
 Pipettenspitzen
 Pipettenspitzen
 Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)
 Rundfilterpapiere (ø 15 cm)
 Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25ml, 50ml)
 Shanddon Coverplate Objektträgerhalterungen
 Slide-A-Lyzer® Dialyse Kassetten
 Slide-A-Lyzer® Mini Dialyse Einheiten

BD Falcon
 Serva
 Sarstedt
 Corning Costar®
 Schleicher & Schuell BioScience
 Pierce
 Amersham Biosciences
 Bio-Rad
 BD Falcon
 Roche
 American National Can™
 BD Falcon
 Eppendorf
 Sarstedt
 Eppendorf
 Macherey-Nagel
 Sarstedt
 Thermo
 Pierce
 Pierce

Sterile Einmalspritzen	BD Plastipak
Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Nalgene®
Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose (0,2 µm)	Bio-Rad
Vacutainer™ CPT™ (8 ml)	BD
Vakuum Sterilfiltrationssystem (50 ml, 500 ml, 1000 ml)	Millipore
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-, 24-, 48 Loch)	Sarstedt
Zellkulturschalen (10 x 2 cm)	BD Falcon
Zellschaber	Corning Costar®

2.1.3 Chemikalien

1-kb DNA Molekulargewichtsleiter	Invitrogen
2-Propanol	Merck
Acrylamidlösung (40%)	Bio-Rad
AICA-Ribosid	Calbiochem
Ampicillin	Ratiopharm
Apo-Transferrin	Sigma
APS	Bio-Rad
Ascorbat	Sigma
Aspirin	Sigma
BacPak™ Complete Medium	BD Biosciences
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Biosafe™ Coomassie	Bio-Rad
Biotin	Sigma
Bisacrylamidlösung (2%)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA, Fraktion V	Sigma
BSA, Fraktion V	Biomol
BSA, Fraktion V, fettsäurefrei	Roche
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Corticosteron	Sigma
DEPC	Fluka
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
Difco™ LB Agar, Miller	BD Biosciences
Difco™ LB Broth, Miller	BD Biosciences
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
DMEM Hochglukose (4,5g/l)	Biochrom AG

DMEM Niedrigglukose (1,0g/l)	Biochrom AG
DMEM/Ham's F-12 mit HEPES und L-Glutamine	Cambrex
Eosin G	Roth
Essigsäure (99%).	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
Express Five® SFM Medium	Gibco
Fenofibrat	Sigma
Fetuin	MP
Formaldehydlösung (37%)	Merck
FCS	Biochrom AG
Full Range Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences
GW9662	Sigma
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth
HEPES	Sigma
IBMX	Serva
Igepal	Sigma
Imidazol	Sigma
Insulin, bovines	Sigma
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Linolsäure	Sigma
LPS (<i>E.coli</i> serotype 055:B5)	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
β-Mercaptoethanol	Sigma
Metformin	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Mifepristone (RU486)	Sigma
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Calbiochem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
NCS	Sigma
Nukleasefreies Wasser	Promega
NuSieve® 3:1 Agarose	Cambrex
Oil Red O	Sigma
Ölsäure	Sigma
Palmitinsäure	Sigma
PBS Dulbecco	Biochrom AG
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche

Pioglitazon	Sigma
Ponceau S Lösung	Sigma
RPMI 1640	Biochrom AG
S.O.C. Medium	Invitrogen
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
SeaKem® GTG® Agarose	Cambrex
SeaKem® LE Agarose	FMC BioProducts
Sf900 II SFM Medium	Gibco
Silbernitrat	Merck
Stearinsäure	Sigma
Sucrose	Sigma
TEMED	Merck
Tris-NH ₃	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Sigma
TRIzol	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween® 20	Sigma
WY14643	Calbiochem
Xylencyanol	Merck
Xylol	Merck

2.1.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgeführt. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT).

2.1.4.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach:

Tris-NH ₃	121	g
Essigsäure (99%)	28,6	ml
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	50	ml
	ad 0,5	l ddH ₂ O

Gelladepuffer, 10-fach:

Glyzerin (87%)	5,8	ml
Bromphenolblau	0,025	g
Xylencyanol	0,025	g
	ad 10	ml 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA**DEPC-Wasser:**

DEPC	1,0	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Nach Zugabe des DEPC wurde die Lösung kräftig geschüttelt, über Nacht bei RT belassen und am nächsten Tag autoklaviert.

Ethanol 75%:

Ethanol	75	ml
DEPC-Wasser	25	ml

2.1.4.3 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen**2.1.4.3.1 Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten****RIPA-Lysepuffer:**

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Vor Gebrauch wurden dem Lysepuffer je eine entsprechende Menge Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Anschließend wurde der Puffer bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4.3.2 Lösungen für SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer (2x Lämmli), 2-fach [186]:

Glyzerin (87%)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	μl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der 2x SDS-Probenpuffer wurde stets im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

SDS-Probenpuffer (5x Lämmli), 5-fach [186]:

Glyzerin (87%)	5	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	600	μl
SDS	1	g
β-Mercaptoethanol	2,5	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der 5x SDS-Probenpuffer wurde stets im Verhältnis 1:4 mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH ₂ O	32,0	ml

Lösung für 10%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH ₂ O	28,5	ml

Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH ₂ O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenngels bzw. des Sammelgels wurden der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 zugegeben.

2.1.4.3.3 Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen [187]**Fixierlösung:**

Methanol	400	ml
Essigsäure (99%)	100	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Inkubationslösung:

Ethanol	300	ml
NaAc x 3 H ₂ O	68	g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	2	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 50 ml Inkubationslösung je 130 µl Glutardialdehyd frisch zugesetzt.

Silberlösung:

AgNO ₃	0,1	g
	ad 100	ml ddH ₂ O

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 50 ml Silberlösung je 10 µl Formaldehyd frisch zugesetzt.

Entwicklerlösung:

Na ₂ CO ₃	5	g
	ad 100	ml ddH ₂ O

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 50 ml Entwicklerlösung je 5 µl Formaldehyd frisch zugesetzt.

Stopplösung:

EDTA	14,6	g
	ad 100	ml ddH ₂ O

2.1.4.3.4 Lösungen für Western-Blotting**Tank-Puffer, 10-fach [188]:**

Glyzin	140	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Wettransfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

PBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

TBS, pH 7,6, 10-fach:

Tris-NH ₃	24,2	g
NaCL	80	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit konzentrierter Salzsäure.

TBS:

TBS, pH 7,6, 10-fach	100	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

TBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l TBS

Blockierlösung PBST:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

Blockierlösung TBST:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml TBST

Die Blockierlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

BSA-PBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

BSA-TBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l TBS

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Primäre Antikörper wurden in diesen Lösungen in der Regel im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

2.1.4.3.5 Lösungen für ELISAs**Lösungen für ELISAs zur Detektion von murinem Adiponektin und humanem Chemerin:****Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

Reagent Diluent:

BSA	5	g
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

Stopplösung:

Schwefelsäure rauchend	5,7	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Verdünnung des Standards, der Antikörper und des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurde der Standard in Reagent Diluent, Capture AK in PBS, Detection AK und HRP-Streptavidin-Konjugat in Reagent Diluent verdünnt.

Verdünnung der Proben:

Die Proben wurden gemäß Herstellerprotokoll in Reagent Diluent verdünnt.

Lösungen für ELISAs zur Detektion von humanen CXCL8:**Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

Coating Buffer, pH 9,5:

NaHCO ₃	7,13	g
Na ₂ HCO ₃	1,59	g
	ad 1,0	l ddH ₂ O

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit 10 N NaOH.

Assay Diluent:

FCS	10	ml
	ad 100	ml PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

Stopplösung:

Schwefelsäure rauchend	5,7	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Verdünnung des Standards, der Antikörper und des Biotin/SAv-Konjugats:

Gemäß Protokoll des Herstellers wurde der Standard in Assay Diluent, Capture AK in Coating Buffer, Detection AK und Biotin/SAv Konjugat in Assay Diluent verdünnt.

Verdünnung der Proben:

Die Proben wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll in Assay Diluent verdünnt.

2.1.4.4 Lösungen für Oil Red O Färbung**Oil Red O Stammlösung:**

Oil Red O	0,175	g
	ad 50	ml 2-Propanol

Die Substanz wurde über Nacht bei 37°C unter Rühren gelöst, anschließend filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Oil Red O Färbelösung:

Oil Red O Stammlösung	9	ml
ddH ₂ O	6	ml

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und filtriert.

Fixierungs-Lösungen:

10% Formaldehyd in PBS
60% 2-Propanol in PBS

2.1.4.5 Lösungen für immunhistologische Färbungen**Citratpuffer, pH 7,1:**

Natriumcitrat	1,47	g
	ad 0,5	l ddH ₂ O

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit konzentrierter Salzsäure.

Waschpuffer:

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l TBS

2.1.5 Kulturmedien

2.1.5.1 Medien für eukaryontische Zellen

Mit Ausnahme des BacPak™ Complete Mediums wurden allen aufgelisteten Zellkulturmedien Penicillin (200 U/ml Medium) und Streptomycin (0.2 mg/ml Medium) als Antibiotika zugesetzt.

2.1.5.1.1 Medien für Insektenzellen

Medium	Supplementation
Express Five™ SFM (H5)	200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
Sf900-Medium II SFM (Sf21)	200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
Sf900-Medium II SFM (Sf21)	10% FCS 200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
BacPak™ Complete Medium (Sf21)	

2.1.5.1.2 Medien für Säugerzellen

Medium	Supplementation
RPMI 1640 (HepG2)	10% FCS 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM (primäre Hepatozyten)	5% FCS 4 ng/ml Hydrocortison 1,67 mU/ml Insulin 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
DMEM Hochglukose (3T3-L1) (Anzuchtmedium)	10% NCS 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin

DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Differenzierungsmedium I)	5% NCS 17 nM Pantothersäure 10 nM Biotin 2 ng/ml apo-Transferrin 30 ng/ml Fetuin 1 µM Corticosteron (frisch zugesetzt) 200 µM Ascorbat (frisch zugesetzt) 2,5 µM IBMX (frisch zugesetzt) 100 nM Insulin (frisch zugesetzt) 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Differenzierungsmedium II)	1 µM Insulin (frisch zugesetzt) 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Kultivierungsmedium)	200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin

2.1.5.2 Medien für *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in Luria-Broth-Flüssigmedium (LB-Medium) bzw. auf Luria-Broth-Agarplatten (LB-Agar).

LB-Medium:	25 g Luria-Broth-Base ad 1 l ddH ₂ O
LB-Agar:	25 g Luria-Broth-Agar ad 1 l ddH ₂ O

Zur Selektion plasmidtragender Klone wurden dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar nach dem Autoklavieren zusätzlich Antibiotikum und Sucrose in unterschiedlichen Kombinationen zugefügt. Die Antibiotika-Stammlösungen in ddH₂O (Ampicillin und Kanamycin) bzw. Ethanol (Chloramphenicol) wurden im Verhältnis 1:1000 mit dem Medium bzw. dem Agar vermischt, die sterilfiltrierte wässrige Sucrose-Lösung im Verhältnis 1:100. Die Endkonzentration im Medium betrug 100 µg/ml für Ampicillin, 50 µg/ml für Kanamycin, 30 µg/ml für Chloramphenicol und 7% (w/v) für Sucrose.

2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche
Cre Rekombinase	BD Biosciences Clontech
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzym <i>Bam</i> H I	Roche
Restriktionsenzym <i>Eco</i> R I	Roche
Restriktionsenzym <i>Pst</i> I	Roche
Restriktionsenzym <i>Xba</i> I	Roche
T4 DNA Ligase	Metabion
Taq DNA Polymerase	Roche

2.1.7 Antikörper

Im Folgenden sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie die Spezies, aus der die Antikörper isoliert wurden, aufgeführt.

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Anti-6xHN pAK	Kaninchen	BD Biosciences
Anti-β-Aktin pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Adiponektin pAK	Ziege	R&D Systems
Anti-Adipophilin mAK	Maus	Acris
Anti-Akt (pan) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-AnnexinA6 pAK	Kaninchen	Carlos Enrich (Kooperation) [189]
Anti-AOX1 mAK	Maus	BD Transduction Laboratories
Anti-ApoE pAK	Ziege	Chemicon
Anti-Chemerin (human) mAK	Maus	R&D Systems
Anti-Chemerin (murin) pAK	Ziege	R&D Systems
Anti-CMKLR1 pAK	Kaninchen	Abcam
Anti-CyclophilinA pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FABP4 pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FAS pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Flotillin-1 mAK (Klon F65020)	Maus	Transduction Laboratories
Anti-Galectin-3 mAK	Maus	BD Transduction Laboratories
Anti-GAPDH mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-GFP mAK	Maus	Abcam
Anti-Omentin pAK	Kaninchen	Pineda Antikörpersevice
Anti-p44/42 MAPK mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-PI3 Kinase p85 pAK	Kaninchen	Upstate
Anti-PPARalpha pAK	Kaninchen	Abcam
Anti-PPARgamma mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies

Anti-Phospho-Akt (Ser473) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Laboratories
Anti-Phospho-p44/42 MAPK mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-SCD1 pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-SOD2 pAK	Kaninchen	LabFrontier

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research
Anti-Maus HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege HRP-konjugierter AK	Kaninchen	Jackson Immuno Research

2.1.8 Kit-Systeme

Nachfolgend sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme aufgeführt.

BCA Protein Assay Kit	Pierce
BacPAK™ Baculovirus Expressions-System	BD Biosciences
BD OptEIA™ Set human IL-8	BD Biosciences
BD TALON™ Buffer Kit	BD Biosciences
BD TALON™ Purification Kit	BD Biosciences
BD Creator™ DNA Cloning Kit	BD Biosciences
Cholesterin	Diaglobal
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
DuoSet® ELISA Development System human Chemerin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System Adiponektin Maus	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
EnVision+ System-HRP (DAB) mouse	Dako
Freie Fettsäuren, Halbmikro-Test	Roche
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche
Human Galectin 3 ELISA	Bender MedSystems
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
pcDNA3.1/V5-His® TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Mini Elute Kit	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
TNT®T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
Triglyceride GPO-PAP, Halbmikro-Test	Roche
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche

2.1.9 Organismen

2.1.9.1 Insektenzellen

Die verwendeten Insektenzelllinien H5 und Sf21 wurden in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 27°C kultiviert.

Zelllinie	Herkunft
High Five™ (H5)	<i>Trichoplusia ni</i> (Invitrogen)
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> 21 (Invitrogen)

2.1.9.2 Eukaryontische Zellen

Nachfolgend sind alle verwendeten murinen und humanen Zelllinien und Zellen aufgeführt. Alle Zellen wurden in einem Brutschrank unter konstanten Bedingungen von 37°C Temperatur, 5% CO₂-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zelllinie	Herkunft
3T3-L1	murine Fibroblasten (American Type Culture Collection)
HepG2	humane Hepatozyten (American Type Culture Collection)

Zellen	Herkunft
Primäre humane Adipozyten	subkutanes Fettgewebe (BioCat)
Primäre humane Hepatozyten	Thomas Weiss (Klinik und Poliklinik für Chirurgie)

2.1.9.3 Bakterien

Die Anzucht der *E.coli* erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C.

GC 5	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96relA1</i> Å« T1R (Biomol)
------	--

2.1.10 RNA

Für die Amplifikation der Omentin cDNA wurde kommerziell erworbene mRNA aus humanen Fettgewebe eingesetzt.

Humane Fettgewebs - mRNA

Biocat

2.1.11 Plasmide

pcDNA3.1

Invitrogen

pcDNA3.1 Annexin A6-GFP

Thomas Grewal (Kooperation) [190, 191]

pcDNA3.1 GFP

Thomas Grewal (Kooperation)

pDNR-Dual Donor Vektor

BD Biosciences

LP-BacPak9 Acceptor Vektor

BD Biosciences

2.1.12 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

2.1.12.1 Primer für die Klonierung

Die zur Amplifizierung der Omentin cDNA verwendeten Primer enthielten neben der genspezifischen Sequenz jeweils eine zusätzlich angefügte Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen, die die Klonierung des amplifizierten cDNA-Fragments in den pDNR-Dual Vektor ermöglichte. Die Erkennungssequenzen von *Bam*H I bzw. *Xba* I sind in den Primersequenzen hervorgehoben.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Omentin_uni	GGGGGATCCTTATGAACCAACTCAGCTTC
Omentin_rev	GGGTCTAGACC CGATAGAATAGAAGCAC

Das mit diesen Primern amplifizierte PCR-Produkt hatte eine Länge von 964 bp.

2.1.12.2 Primer für die Sequenzierung

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
pDNR-Dual_uni	GTAAAACGACGGCCAG
pDNR-Dual_rev	ACCTCAGAACTCCATC

2.1.12.3 Primer für LightCycler-Analysen

Die Primer für die LightCycler Expressionsanalysen wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp garantierte kürzestmögliche Elongationszeiten. Zudem wurden die Primer so entworfen, dass die *Annealing*-Temperatur etwa 60°C betrug (Roche Applied Science, Universal ProbeLibrary Assay Design Center: www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp).

Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit Hilfe des jeweiligen uni-Primers durch die Firma GeneArt (Regensburg) verifiziert.

2.1.12.3.1 Oligonukleotide zur Amplifikation humaner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
18S rRNA_uni	GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC	217
18S rRNA_rev	CATCTAAGGGCATCACAGACC	
AOX1_uni	AGCCATTGACATAGGCCAGA	112
AOX1_rev	GTCTGGACCACGAGTGTGC	
Omentin_uni	GGGTCACCGGATGTAACACT	242
Omentin_rev	TGTTCTCCATCCTTGGGATCT	
SOD2_uni	GTTGGCCAAGGGAGATGTTA	316
SOD2_rev	GCCGTCAGCTTCTCCTTAAA	

2.1.12.3.2 Oligonukleotide zur Amplifikation muriner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
AOX1_m_uni	AAACCCAGCCCTTGACATAG	399
AOX1_m_rev	GGCTCATCTCTTGGGATCAT	
GAPDH_m_uni	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	375
GAPDH_m_rev	AGGGAGATGCTCAGTGTTGG	
PPAR- α _m_uni	AACTGGATGACAGTGACATTTCC	197
PPAR- α _m_rev	CCGAAGGTCCACCATTTTT	
PPAR- γ _m_uni	TTATAGCTGTCATTATTCTCAGTGGAG	291
PPAR- γ _m_rev	GGGTGGGACTTTCCTGCTA	

2.1.12.3.3 Oligonukleotide zur Amplifikation von Ratten-Genen

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
18S rRNA_r_uni	GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC	217
18S RNA_r_rev	CATCTAAGGGCATCACAGACC	
Aktin_r_uni	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG	290
Aktin_r_rev	CTTGATCTTCATGGTGCTAGG	
AOX1_r_uni	ACCATGGAAGCTCACTAGTCCT	249
AOX1_r_rev	AGCAGTGCTGTGGATGATTCT	
Galectin3_r_uni	CCAACTGGCCCTAGTGCTTA	277
Galectin3_r_rev	GGCTTCACTGTGCCTATGATT	
GAPDH_r_uni	CCCTCTGGAAAGCTGTGG	220
GAPDH_r_rev	GCTTCACCACCTTCTTGATGT	
PPAR- α _r_uni	ACGATGCTGTCCTCCTTGAT	258
PPAR- α _r_rev	CCCTCCTGCAACTTCTCAAT	
PPAR- γ _r_uni	TTATAGCTGTCATTATTCTCAGTGGAG	251
PPAR- γ _r_rev	CTGGAGCAGAGGGTGAAGG	

2.1.13 siRNA-Sequenzen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Silencer® Pre-designed* siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen.

siRNA	Sequenz (5' → 3')	Identifikationsnummer
AOX1_sense (human)	GCCAAUGCCUGUCUGAUUCtt	116950
AOX1_antisense (human)	GAAUCAGACAGGCAUUGGCtg	
Galectin 3_sense (murin)	CAUUCAAAAUACAAGUCCUtt	s201593
Galectin 3_antisense (murin)	AGGACUUGUAUUUUGAAUGgt	
SOD2_sense (murin)	GCUCUAAUCAGGACCCAUUtt	s74129
SOD2_antisense (murin)	AAUGGGUCCUGAUUAGAGCag	

Als Kontrolle für die genspezifischen siRNAs diente die *Silencer®* Negative Control #1 siRNA der Firma Ambion.

2.1.14 Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Herkunft	Bezug
Humanes Adiponektin	mMyeloma	R&D Systems
Humanes Chemerin	<i>E. coli</i>	R&D Systems
Humanes Galectin 3	<i>E. coli</i>	R&D Systems
Humanes Omentin	Hek 293	Alexis

2.1.15 Proteinextrakte

Für die Analyse einer möglichen differenziellen Expression verschiedener Proteine in humanen Präadipozyten und reifen Adipozyten wurden kommerziell erworbene Gesamtproteinextrakte der Firma Biocat verwendet. Die Lysate wurden aus primären humanen Präadipozyten bzw. Adipozyten, die aus den entsprechenden Präadipozyten in vitro differenziert wurden, gewonnen. Als Ausgangsmaterial für die Isolation diente subkutanes Fettgewebe gesunder Frauen unterschiedlichen Alters.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli*-Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C in einem Brutschrank. Um Einzelkolonien zu erhalten, etwa nach einer Transformation, wurden die Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Dem Agar zugesetztes Antibiotikum erlaubte eine positive Selektion der plasmidtragenden Bakterien, da nur Zellen mit der durch das Plasmid vermittelten Resistenz wachsen konnten. Zur weiteren Vermehrung eines Klons wurde die Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte in Flüssigmedium überführt, welches das gleiche Antibiotikum enthielt.

2.2.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Die verwendeten Insektenzellen H5 und Sf21 wurden jeweils in 75 cm² Zellkulturflaschen für semi-adhärenente Zellen mit 10 ml Medium bei 27°C in einem Brutschrank kultiviert. Die Zellen stellten unterschiedliche Ansprüche an das Medium. Während die H5-Zellen in serumfreiem Express Five-Medium herangezogen werden konnten, benötigten die Sf21-Zellen einen Zusatz von 10% FCS zum Sf900-Medium für ihr Wachstum. Unter optimalen Wachstumsbedingungen setzten sich die Zellen am Boden der Zellkulturflasche ab und bildeten einen Monolayer. Nach 3-4 Tagen bedeckten die Zellen etwa 80-90% des Flaschenbodens und konnten passagiert werden. Hierbei wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst, mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (300 g, 5 min). Der Überstand wurde abgezogen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 bis 1:6 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der humanen Leberzelllinie HepG2 erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen. Die Zellen wurden in 10 ml mit 10% FCS supplementierten RPMI 1640 Medium in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre herangezogen. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, wenn der Zellmonolayer etwa 80-90% des Flaschenbodens bedeckte, passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen

mit 3 ml Trypsin/EDTA überschichtet. Während einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C spaltet das Trypsin Zell-Zell Kontakte und die Zellen lösten sich vom Flaschenboden. Die HepG2 Zellen wurden unverzüglich in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 ml vorgelegtem Medium überführt, um den Trypsinverdau abzustoppen, abzentrifugiert (300 g, 5 min), in frischen Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Passagierung erfolgte in einem Verhältnis von 1:6.

2.2.1.4 Kultivierung muriner Zelllinien

Die murine Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 ist eine der am häufigsten verwendeten und am besten charakterisierten präadipozytären Zelllinien für die Untersuchung der Differenzierung und der Funktion von Adipozyten [192]. Die 3T3-L1 Zelllinie ist ein Klon der aus Swiss Mausembryonen gewonnenen Fibroblastenzelllinie 3T3, die sich durch ihre Fähigkeit, im konfluenten Zustand zu Adipozyten zu differenzieren, auszeichnet [193, 194]. Durch die Zugabe einer Mischung definierter die Adipogenese fördernder Substanzen lässt sich die Differenzierung der Zellen synchronisieren und somit die Konsistenz der Ergebnisse erhöhen. Die erhaltenen reifen 3T3-L1 Adipozyten zeichnen sich sowohl funktionell als auch morphologisch, z.B. in der Ausbildung und Anordnung der Lipidtropfen, durch ihre Ähnlichkeit zu primären Adipozyten aus [192].

Da mehrere Differenzierungsprotokolle etabliert sind, können sich Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen unterscheiden. Eine erfolgreiche Differenzierung der 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten ist zum einen durch den Übergang von einem präadipozytären zu einem adipozytären Phänotyp gekennzeichnet, u. a. durch die stark erhöhte Synthese und Einlagerung von Triglyzeriden, die sich in Form von Lipidtröpfchen mikroskopisch erkennen lassen, sowie durch die Induktion adipozytenspezifischer Gene, wie z.B. *CCAAT/enhancer Binding Protein alpha, beta und delta* (C/EBP α , β und δ), PPAR γ , und Proteine, wie z.B. *Fatty Acid Synthase* (FAS), Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), Leptin und Adiponektin [192, 195-197].

2.2.1.4.1 Kultivierung von 3T3-L1 Zellen

Die murine Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen für adhäre Zellen in 12 ml DMEM Hochglukose Medium supplementiert mit 10% NCS (Anzuchtmedium, s. 2.1.5.1.2) in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Zur Stammerhaltung wurden die Zellen einmal

wöchentlich nach Erreichen von 80-90% Konfluenz passagiert. Hierfür wurden die Zellen 10 Minuten bei 37°C durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst, abzentrifugiert (100 g, 6 min), in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:12 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.4.2 Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten

Das in dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll wurde bereits beschrieben [198]. Für die Differenzierung wurden 3T3-L1 Fibroblasten der Passage 3 bis 9 wie oben beschrieben in Anzuchtmedium kultiviert, bei einer Konfluenz von 80-90% trypsiniert, und in einer Dichte von 5.000 Zellen pro cm² in Zellkulturschalen in frischem Anzuchtmedium ausgesät. Am nächsten Tag (Tag 0 der Differenzierung) wurde das Medium gewechselt und die Differenzierung durch Zugabe von DMEM/Ham's F-12 Medium mit u. a. 5% NCS, 100 nM Insulin, 2,5 µM IMBX, 200 µM Ascorbat und 1 µM Corticosteron (Differenzierungsmedium I, s. 2.1.5.1.2) induziert. An den Tagen 3 und 6 wurde das Differenzierungsmedium erneuert. Am Tag 7 wurde das Medium gewechselt und DMEM/Ham's F-12 Medium lediglich mit 1 µM Insulin als weiteren Zusatz (Differenzierungsmedium II, s. 2.1.5.1.2) zu den Zellen gegeben. Am Tag 8 erfolgte ein weiterer Mediumwechsel und die Zellen wurden auf serumfreies DMEM/Ham's F-12 Medium (Kultivierungsmedium, s. 2.1.5.1.2) gesetzt. Am Tag 9 war die Differenzierung vollständig abgeschlossen, und der Grad der Adipozytendifferenzierung wurde mikroskopisch bzw. durch Oil Red O Färbung der Lipidtropfen kontrolliert.

2.2.1.4.3 Stimulation von 3T3-L1 Zellen

Stimulation der 3T3-L1 Zellen erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Substanz zum frischen Medium im Anschluss an den Mediumwechsel entweder während der Differenzierung an den Tagen 0, 3, 6, 7 und 8, oder für eine vierundzwanzigstündige Inkubation einzig am Tag 8. Zellen und Überstand wurden soweit nicht anders angegeben am Tag 9 geerntet.

Für die Untersuchung der Wirkung von Normal- bzw. Hochglukosebedingungen auf Adipozyten wurden die reifen 3T3-L1 Adipozyten ab Tag 9 in DMEM Medium mit 1,0 (5 mM) bzw. 4,5 g/l (25 mM) Glukose kultiviert. An den Tagen 10 und 12 erfolgte ein Mediumwechsel sowie ggf. am Tag 12 eine Stimulation mit Insulin. Zellen und Überstände wurden soweit nicht anders angegeben am Tag 13 geerntet.

2.2.1.4.4 Transfektion von 3T3-L1 Zellen mit siRNA

Das Einbringen von siRNA in Zellen wird zum spezifischen Knock-down eines Zielgens verwendet. Die durch Transfektion eingebrachte siRNA besteht hierbei aus doppelsträngiger RNA (dsRNA), deren Sequenz einem bestimmten mRNA Abschnitt des Zielgens entspricht. Die dsRNA wird in der Zelle in einem durch das Protein Dicer vermittelten Prozess in 19–22 bp lange Oligonukleotide gespalten, deren Antisensestrang anschließend vom *RNA induced silencing complex (RISC)* zur gerichteten Spaltung und Degradation komplementärer mRNA Sequenzen verwendet wird [199]. Somit ist es möglich, die Expression eines ausgewählten Gens zu unterdrücken, ohne die Expression anderer Gene zu verändern.

Die Transfektion von 3T3-L1 Zellen mit siRNA wurde mit dem X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent von Roche durchgeführt. Ein Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

siRNA (100 nM)	10	µl
X-treme	5	µl
DMEM/Ham's F-12 Medium, serumfrei	85	µl

Hierbei wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers zunächst das Medium in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, anschließend die siRNA und zuletzt das Transfektionsreagenz zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf 3T3-L1 Zellen, i.d.R. am Tag 0 der Differenzierung, in 900 µl frischem Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben differenziert und ggf. stimuliert.

2.2.1.4.5 Transfektion von 3T3-L1 Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Überexpression von Annexin A6 in 3T3-L1 Zellen wurden im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise Plasmide von Dr. Thomas Grewal (Faculty of Pharmacy, University of Sydney) zur Verfügung gestellt [190, 191]. Die Plasmide basieren auf dem pcDNA3.1 Vektor der Firma Invitrogen, in welchen die murine AnnexinA6 cDNA zusammen mit der Sequenz für einen C-terminalen GFP-Tag (pcDNA3.1 Annexin A6-GFP) bzw. ausschließlich die GFP-Sequenz (pcDNA3.1 GFP) eingebracht wurde. Der

Cytomegalievirus (CMV) Promotor des pcDNA3.1 Vektors erlaubte eine starke und konstitutive Expression der eingebrachten DNA.

Die Transfektion von 3T3-L1 Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGENE® HD von Roche durchgeführt. Ein Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA (2 µg)	7	µl
FuGENE® HD	8	µl
DMEM/Ham's F-12 Medium, serumfrei	85	µl

Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurde zunächst das Medium in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, anschließend die Plasmid-DNA und zuletzt das Transfektionsreagenz zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf 3T3-L1 Zellen am Tag 1 der Differenzierung in 900 µl frischem Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben differenziert und ggf. stimuliert.

2.2.1.5 Kultivierung von primären humanen Zellen

2.2.1.5.1 Kultivierung von primären humanen Adipozyten

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Adipozyten wurden von der Firma Biocat bezogen. Die Adipozyten wurden in vitro aus Präadipozyten differenziert, die aus dem subkutanen Fettgewebe gesunder normalgewichtiger Spenderinnen isoliert wurden. Die Zellen wurden nach Erhalt entsprechend den Angaben des Herstellers eine Nacht im mitgelieferten Medium belassen. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreien DMEM/Ham's F-12 Medium, in welchem auch die Stimulation mit Adiponektin bzw. Metformin durchgeführt wurde.

2.2.1.5.2 Kultivierung von primären humanen Hepatozyten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären humanen Hepatozyten wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thomas Weiss (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) aus humanem Lebergewebe isoliert, das Spendern im Zuge einer Leberresektion, i.d.R. auf Grund der Diagnose eines Leberkarzinoms,

entnommen worden war. Es wurden ausschließlich Hepatozyten aus angrenzendem gesundem Gewebe isoliert.

Die isolierten Zellen wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen pro cm^2 in Zellkulturschalen in DMEM supplementiert mit 4 ng/ml Hydrocortison, 1,67 mU/ml Insulin, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 5 % FCS ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit serum- und supplementfreiem DMEM. Auch alle weiteren Stimulationen wurden in diesem Medium durchgeführt.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde der NucleoSpin® Plasmid-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Ausgehend von 3 ml Übernachtskultur wurde die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [200]: die Bakterienzellen werden zunächst mit Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen und die chromosomale DNA und die Proteine durch eine nachfolgende Neutralisation mit Natriumacetat ausgefällt. Anschließend wird die Plasmid-DNA an eine Silikamembran gebunden und verbliebene Verunreinigungen durch Waschen der Membran entfernt. Der Reinheitsgrad der erhaltenen Plasmid-DNA ist ausreichend für Klonierungen und Sequenzierungen.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Lösung im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt und die Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser als Referenz gemessen.

Ausgehend von der gemessenen Extinktion bei 260 nm und unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (V) und des für doppelsträngige DNA spezifischen Extinktionsfaktors von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (ϵ_{dsDNA}) konnte mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die DNA-Konzentration (c_{dsDNA}) berechnet werden.

$$c_{\text{dsDNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{dsDNA}} \cdot V$$

c_{dsDNA} : Konzentration an dsDNA in der Lösung [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
 ϵ_{dsDNA} : Extinktionskoeffizient von dsDNA, gleich $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
 V : Verdünnungsfaktor, hier 100

Die Reinheit der DNA konnte durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Bei reiner, nicht degradierter DNA liegt das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} zwischen 1,8 und 2,1.

2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Größe von DNA-Molekülen konnte durch die Auftrennung der DNA in 0,7% bis 3%igen Agarosegelen analysiert werden. Die Agarose wurde in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Die noch heiße Gellösung wurde dann mit 1 μl Ethidiumbromid (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt und in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach Abschluß der Polymerisation wurde das Gel in die Apparatur eingesetzt und mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben wurden in Gelladepuffer aufgenommen, in die Taschen gefüllt und bei einer Spannung von 80 V im Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde neben den Proben auch eine 1 kb-DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen. Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente konnten dann über einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht, fotografiert und gegebenenfalls für eine Aufreinigung ausgeschnitten werden.

2.2.2.4 Reinigung von DNA

2.2.2.4.1 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Die Aufreinigung von DNA-Stücken aus Reaktionsansätzen erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Mini Elute Kit laut dem Protokoll des Herstellers.

2.2.2.4.2 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Um ein spezifisches DNA-Stück aus einem Fragmentgemisch zu erhalten, wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und auf einem UV-Flächenstrahler die entsprechende Bande mit einem Deckglässchen ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kit gemäß den Angaben des Herstellers aus dem Gelstück eluiert.

2.2.2.5 Inkubation mit Restriktionsenzymen

Definierte Schnitte wurden in eine DNA mit Restriktionsendonukleasen eingeführt. Die DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen bei 37°C für 90 bis 120 min inkubiert, und die erhaltenen Fragmente über Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.2.6 Inkubation mit Alkalischer Phosphatase

Nach der Einführung definierter Schnitte mit Restriktionsendonukleasen wurde Plasmid-DNA vor der Ligation mit einem DNA-Fragment mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die 5' Enden der DNA zu dephosphorylieren und so eine spontane Religation des Plasmides zu verhindern. Hierzu wurde die Plasmid-DNA für 10 min bei 37°C mit dem Enzym inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch eine zehnminütige Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C abgestoppt.

2.2.2.7 Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragments mit Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese Ligase kann DNA-Stücke sowohl über komplementäre sticky ends als auch über blunt ends miteinander verbinden. Im Folgenden wird das Pipettierschema eines typischen Ligationsansatzes wiedergegeben. Das optimale molare Verhältnis von Insert-DNA und Vektor-DNA liegt bei 1:3.

Insert-DNA	4	µl (ca. 280 ng)
Vektor-DNA	0,5	µl (ca. 90 ng)
5x Ligasepuffer	4	µl
T4-DNA-Ligase	1	µl
ddH ₂ O	11,5	µl

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.2.2.8 Klonierung mit Hilfe der Cre-Rekombinase

Der in vorliegender Arbeit verwendete BD Creator™ DNA Cloning Kit von BD Biosciences ermöglicht es, ein DNA-Fragment innerhalb kürzester Zeit von einem Donor Vektor in einen Akzeptor Vektor zu klonieren. Das Funktionsprinzip des Systems beruht auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1. Bei der Ring-zu-Ring-Replikation des Bakteriophagen-genoms können sich DNA-Dimere bilden, die von einem Enzym, der

Cre-Rekombinase, aufgelöst werden. Die Cre-Rekombinase bindet bei diesem Vorgang an spezifische Sequenzen im P1-Genom, den sogenannten loxP-Stellen, und vermittelt dort den kreuzweisen Austausch der DNA-Stränge [201, 202].

Der BD Creator™ DNA Cloning Kit von BD Biosciences nutzt das Cre-loxP Transfersystem zum einfachen Transfer eines DNA-Fragments aus einem Donor Vektor in unterschiedlichste Akzeptor Vektoren. Das gewünschte DNA-Stück wird auf herkömmliche Weise in die MCS des Donor Vektors kloniert, die sich zwischen zwei loxP-Sequenzen befindet. Durch eine kurze Inkubation mit der Cre-Rekombinase kann das DNA-Stück zwischen den loxP-Elementen in jeden Akzeptor Vektor mit einem loxP-Element transferiert werden. Das DNA-Stück wird aufgrund der zentralen Sequenz der loxP automatisch in der richtigen Orientierung in den Akzeptor Vektor eingebaut. Ebenso wird das Leseraster vom Donor Vektor in den Akzeptor Vektor übernommen.

Ein Reaktionsansatz der Cre-loxP Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Donor Vektor mit cDNA-Insert	200	ng
Akzeptorvektor	200	ng
10x Cre-Reaktionspuffer	2	µl
10x BSA (1 mg/ml)	2	µl
Cre-Rekombinase	1	µl
	ad 20	µl ddH ₂ O

Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation vermittelt die Cre-Rekombinase den spezifischen Transfer der loxP-flankierten Region des Donor Vektors in die loxP-Sequenz des Akzeptor Vektors. Nach der Inkubation wurde die Cre-Rekombinase bei 70°C für 5 min hitzeinaktiviert.

2.2.2.9 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurde nach dem Hitzeschockverfahren durchgeführt.

Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA vermischt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst 30 min auf Eis gehalten, dann bei 42°C für 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach der Transformation wurden die Zellen in 0,5 ml vorgewärmtem SOC-Medium ohne Zusatz von Antibiotika bei 37°C für 1 h unter Schütteln inkubiert, bevor sie auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert wurden.

2.2.2.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) ist ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung spezifischer Nukleotidsequenzen [203]. Selbst geringe Mengen eines DNA-Abschnitts in einem komplexen DNA-Gemisch können mit Hilfe der PCR selektiv amplifiziert und so weiteren Analysen zugänglich gemacht werden. Der Ablauf der PCR-Reaktion ähnelt dem der Replikation: eine DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von dem 3'-Ende eines an den DNA-Einzelstrang angelagerten Primers den komplementären Gegenstrang. Durch die Verwendung von zwei gegenläufig orientierten Primern lässt sich die Sequenz zwischen dem Primerpaar gezielt vervielfältigen.

Die PCR-Reaktion lässt sich in fünf Schritte gliedern. In einem initialen zehnminütigen Denaturierungsschritt werden die DNA-Moleküle bei 95°C in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend folgen 25 bis 30 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Extension, in welchen die Amplifikation der Zielsequenz abläuft. In jedem Zyklus wird die DNA zunächst in Einzelstränge überführt (Denaturierung, 30 s, 95°C), bevor bei einer niedrigeren Temperatur die beiden Primer an ihre jeweiligen komplementären Zielsequenzen hybridisieren (Annealing, 1 min, meist im Bereich von 60-65°C) und die hitzestabile DNA-Polymerase ausgehend von den gebundenen Primermolekülen an der Matrizen-DNA den komplementären Strang synthetisiert (Extension, ca. 1 min pro kb, 72°C). Ein abschließender Elongationsschritt von 10 min bei 72°C erlaubt der DNA-Polymerase, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen.

Die Annealing-Temperatur richtet sich nach Länge und Sequenz der eingesetzten Primer. Sie liegt etwa 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer, weshalb Primer mit möglichst ähnlichen Schmelztemperaturen gewählt wurden. Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert und gegebenenfalls für eine anschließende Klonierung aufgereinigt.

2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Klonierungen und PCR-Produkte wurden durch Analyse der DNA-Sequenz auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GeneArt (Regensburg) unter Verwendung des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger [204] durchgeführt. Es wurden vektor- oder sequenz-spezifische Primer für die Sequenzierungsreaktionen eingesetzt.

2.2.2.12 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR ist ein Verfahren zur schnellen, sensitiven und reproduzierbaren Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Amplifikation des PCR-Produkts kann während des gesamten Reaktionsverlaufs verfolgt und die absoluten bzw. relativen Mengen an DNA im eingesetzten Probenmaterial anhand einer Standardkurve berechnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Real-Time RT-PCR verwendet zur Analyse der Genexpression im subkutanen und viszeralen humanen Fettgewebe, im subkutanen und viszeralen Fettgewebe von Zuckerratten und im viszeralen Fettgewebe von Hochfettratten, sowie in 3T3-L1 Zellen während der Differenzierung zu Adipozyten und in primären humanen Hepatozyten nach Stimulation mit rekombinanten humanen Omentin, Galectin 3 und Chemerin.

Gesamt-RNA wurde aus Gewebe bzw. Zellen isoliert und in einzelsträngige cDNA überführt, welche als Probenmaterial in der Real-Time RT-PCR eingesetzt wurde. Für alle Versuche wurde der LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) verwendet. Im Folgenden ist ein typischer Reaktionsansatz wiedergegeben:

Reaktionsmix (Roche)	2	µl
MgCl ₂ , 25 mM	2,4	µl
universe Primer, 5 pmol/µl	1	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1	µl
cDNA	2	µl
ddH ₂ O	11,6	µl

SYBR Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix bereits enthalten. Die Reaktion lief in dünnen Glaskapillaren ab, die über ein Probenkarussell in die Reaktionskammer eingebracht wurden. In der Reaktionskammer wurden die Proben zunächst für 10 min auf 95°C erhitzt, um die HotStart Taq-Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 45 Amplifizierungszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus setzte sich aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 60°C und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammen. Die exakte Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des für die jeweilige Reaktion verwendeten Primerpaares.

Zur Berechnung der Ausgangskonzentration an cDNA wurde in jedem Amplifikationszyklus nach Abschluss der Elongationsphase, bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C), die Fluoreszenz der Probe gemessen. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I in doppelsträngige DNA-Moleküle einlagert, verhält

sich dessen Fluoreszenzintensität proportional zur Bildung des PCR-Produkts. Die Messung der Fluoreszenz ermöglichte es so, die Amplifikation während des gesamten Reaktionsverlaufs zu verfolgen.

Eine Auftragung der Fluoreszenzmesswerte in einem Graphen gegen die Zyklenzahl ermöglichte es, den Crossing Point (Cp) während der Exponentialphase der PCR zu bestimmen. Der Cp bezeichnet den Reaktionszyklus, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts einen deutlich positiven Wert über der Hintergrundfluoreszenz des Messsystems annimmt, und ist proportional zur Ausgangskonzentration der Nukleinsäure im eingesetzten Probenmaterial. Verschiedene Proben unterscheiden sich in ihren Cp-Werten, da eine unterschiedliche Zahl an Amplifikationszyklen benötigt wird, um in Abhängigkeit von ihrer Ausgangskonzentration an Nukleinsäuren diese Detektionsschwelle zu erreichen.

Als relativer Standard wurde bei jedem Lauf eine 1:1-Verdünnungsreihe von cDNA in Wasser mitgeführt. Jeder der vier Standardproben wurde hierbei ein definierter Konzentrationswert zugewiesen. Über eine Auftragung der Cp-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus der Konzentration wurde nun eine Standardkurve erstellt, die jedem Cp-Wert der Proben einen entsprechenden Zahlenwert für die relative Konzentration zuordnete. Diese Umrechnung der Cp-Werte mit Hilfe der Standardkurve in definierte Zahlenwerte erlaubt es, PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Effizienzen zu vergleichen.

Neben der mRNA des Zielgens wurde in den Proben parallel auch die mRNA eines Housekeeping Gens bestimmt. Ein Housekeeping Gen wird in den verschiedenen Geweben bzw. durch die verwendete Stimulation der Zellen nicht reguliert. Die Expression des Zielgens wurde relativ zur Expression dieses Referenzgens berechnet. Der Quotient aus Konzentration $cDNA_{\text{Zielgen}}$ zu Konzentration $cDNA_{\text{Housekeeping Gen}}$ gibt somit einen zum Referenzgen normalisierten Wert wieder, der für Qualitäts- und Quantitätsunterschiede, die während der Probenvorbereitung auftreten, korrigiert ist. Der Quotient der normalisierten Werte zweier Proben wiederum drückt die relative Expression des Zielgens in Abhängigkeit von der verwendeten Stimulation bzw. in den verschiedenen Geweben aus.

Nach der Amplifikation wurde bei jedem Lauf noch die Spezifität des PCR-Produktes anhand einer Schmelzkurve analysiert. Die DNA wurde langsam ($0,1^{\circ}\text{C/s}$) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz während dieser Phase kontinuierlich gemessen. Bei einer spezifischen Reaktion wird nur ein Produkt gebildet. Dieses schmilzt bei einer charakteristischen Temperatur, wodurch die Fluoreszenz abrupt abnimmt. Eine unspezifische Reaktion ist dagegen durch mehrere Produkte mit unterschiedlichen

Schmelzpunkten gekennzeichnet, was zu einer unscharfen Abnahme der Fluoreszenz über mehrere Stufen führt.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Gesamt-RNA aus 3T3-L1 Zellen wurde mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen isoliert. Der Zellüberstand wurde abgenommen und für anderweitige Versuche verwendet. Die Zellen wurden mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst, mit PBS gewaschen und mit 500 µl RLT-Puffer lysiert. Anschließend wurde die genomische DNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Lysats durch eine dünne Kanüle geschert und die RNA gemäß Herstellerangaben über Säulchentechnik isoliert. Die RNA wurde zweimal mit je 30 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) von dem Säulchen eluiert und bei –80°C aufbewahrt.

Isolation der Gesamt-RNA aus Fettgewebe erfolgte mit TRIzol Reagenz von Invitrogen. Hierfür wurden 50 mg des in RNAlater Reagenz aufbewahrten Gewebes in 1 ml TRIzol dreimal 30 s mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat abzentrifugiert (300 g, 10 min.), um Gewebereste und Fett zu entfernen, die genomische DNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Homogenats durch eine dünnen Kanüle geschert, und die RNA laut Herstellerangaben isoliert, wobei zur Verbesserung der Reinheit zweimal mit Chloroform extrahiert wurde. Die RNA wurde in 30 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) aufgenommen und bei –80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration einer Lösung wurde wie die DNA-Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer 1:100–Verdünnung in nukleasefreiem Wasser bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte ebenfalls mit dem Lambert-Beerschen Gesetz. Jedoch wurde nun der für RNA spezifische Extinktionskoeffizient von 40 µg ml⁻¹ in die Formel eingesetzt.

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

- C_{RNA} : Konzentration an RNA in der Lösung [µg·ml⁻¹]
- E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
- ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient von RNA, gleich 40 µg·ml⁻¹
- V : Verdünnungsfaktor, hier 100

2.2.3.3 Reverse Transkription

Für den Einsatz in PCR-Reaktionen, z.B. in Real-Time RT-PCR, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit der Reversen Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA überführt. Die Reaktion wurde unter Verwendung des Reverse Transcription System von Promega durchgeführt. Als Primer wurden Random Hexamer Primer eingesetzt, die an komplementären Sequenzen innerhalb der RNA-Moleküle hybridisierten und als Ausgangspunkt für die Synthese des cDNA-Stranges an der RNA-Matrize durch die Reverse Transkriptase dienten. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

MgCl ₂ , 25 mM	8	µl
RT-Puffer, 10 x	4	µl
dNTP-Mix, 10 mM	4	µl
Random Hexamer Primer, 0,5 µg/µl	1	µl
RNasin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/µl	1	µl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/µl	1,2	µl
RNA (1 µg) in nukleasefreiem Wasser	20,8	µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde die AMV-RT durch fünfminütige Inkubation bei 95°C hitzeinaktiviert und die cDNA anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Präparation von Proteinextrakten

Die Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der Zellüberstand wurde abgezogen, die Zellen in eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitor mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturflasche bzw. -schale gelöst, abzentrifugiert, das Zellpellet in 30 µl eiskalten RIPA-Zelllysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und auf Eis die genomische DNA im Zelllysats mit Ultraschall geschert. Für die Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Fettgewebe wurden 100 mg des Gewebes unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen und in 2 ml eiskalten RIPA-Zelllysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren dreimal für 30 s mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Im Anschluß wurde das Homogenat abzentrifugiert (300 g, 10 min), um Gewebereste und Fett zu entfernen.

Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Bicinchoninsäure (BCA) Methode bestimmt [205]. 200 µl einer 1:50-Mischung von 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure wurden mit 10 µl einer 1:10-Verdünnung der Probe in PBS versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine reduzieren die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen, die mit der Bicinchoninsäure unter Bildung eines violetten BCA-Cu^{1+} -Komplexes weiterreagieren. Dieser Farbkomplex zeigt bei einer Wellenlänge von 562 nm eine starke Absorption und kann photometrisch nachgewiesen werden. Da die Produktbildung proportional zur Proteinmenge ist, konnte über eine BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proben werden vor der Elektrophorese in einem Probenpuffer aufgekocht, der SDS und β -Mercaptoethanol enthält. Die Proteine werden unter diesen Bedingungen denaturiert. Gleichzeitig lagern sich die negativ geladenen SDS-Moleküle gleichmäßig an den aufgefalteten Proteinen an, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und die Polypeptidketten eine konstant negative Ladung pro Masseneinheit erhalten. Die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld erfolgt daher ausschließlich in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und der Porengröße des Polyacrylamidgels.

Die SDS-Polyacrylamidgele, die in dieser Arbeit verwendet wurden, bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10 bzw. 15%igen Trenngel. Die Gellösungen wurden mit entsprechenden Mengen an APS und TEMED vermischt, die die radikalische Polymerisation des Acrylamids auslösten, und nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen: zuerst unten das engmaschige Trenngel, das der Auftrennung der Proteine diente, und dann darauf das großporige Sammelgel mit den Taschen, in dem die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel aufkonzentriert wurden. Nachdem die Acrylamidlösungen vollständig auspolymerisiert waren, wurden die Gele in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und mit 1x SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht und in die Taschen gefüllt. Sofern nicht anders angegeben wurden pro Spur 20 µg Protein geladen. Neben den Proben wurde auf das Gel auch ein Proteinstandard, der Full-Range Rainbow Molecular Weight

Marker, aufgetragen, mit dem die Größe der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden konnte. Die Elektrophorese wurde ca. 60 min bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.4.4 Silberfärbung

Einen sehr sensitiven Nachweis von Proteinen in Acrylamidgelen liefert die Silberfärbung. Proteine und Silberionen gehen einen Komplex ein, der durch die Reduktion mit Formaldehyd sichtbar gemacht wird. Die Silberionen werden bei dieser Reaktion zu elementarem Silber reduziert, das als unlösliches braunes Präzipitat ausfällt.

Die Silberfärbung wurde nach dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick durchgeführt [187]. Das Gel wurde nach der Gelelektrophorese zunächst 30 min in der Fixierlösung und anschließend 30 min in der Inkubationslösung inkubiert. Dann wurde das Gel dreimal für je 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend 40 min in der Silberlösung geschwenkt. Das Gel wurde noch einmal kurz mit Wasser gewaschen, bevor die Reduktion der Silberionen in der Entwicklerlösung erfolgte. Das Gel wurde solange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis die Proteine deutlich als braune Banden zu erkennen waren. Dann wurde die Reaktion durch die EDTA-haltige Stopplösung abgebrochen. Das Gel wurde kurz in Wasser gewaschen und mit dem DryEase® Mini-Gel Drying System getrocknet.

2.2.4.5 Western-Blotting

Als Western-Blotting wird der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran und deren anschließende immunchemische Detektion auf der Membran bezeichnet [188].

In dieser Arbeit wurde für den Proteintransfer das Wettransfer-Verfahren verwendet, d.h. der Elektrotransfer wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer durchgeführt. Die für den Blot benötigten Schwämmchen und Filterkartons, sowie das SDS-Acrylamidgel und die Membran wurden kurz in Wettransferpuffer äquilibriert. Die eingesetzte Immun-Blot™ PVDF Membran (BIORAD) musste vor der Äquilibration kurz mit Methanol benetzt werden. Der Blot wurde dann wie folgt aufgebaut: zuunterst ein Schwämmchen, dann zwei Filterpapiere, darauf die Membran und das Gel, gefolgt von zwei weiteren Filterpapieren und dem zweiten Schwämmchen. Mit einer Pipette wurde mehrmals über dieses Blot-Sandwich gerollt, um Luftbläschen zu entfernen. Das Sandwich wurde dann in eine Kassette eingespannt und so in die Blot-Apparatur gesetzt, dass die Membran zur

Anode orientiert war. Die Kammer wurde mit Wettransferpuffer gefüllt, bis der Blot gut bedeckt war. Ein zusätzlich eingesetzter Eisblock sorgte für die Kühlung des Puffers während des Transfers. Anschließend wurden die Proteine 60 min bei einer konstanten Spannung von 80 V auf die Membran übertragen.

Nach dem Transfer erfolgte die Detektion der auf der Membran immobilisierten Proteine über eine Antikörper-gekoppelte Chemilumineszenzreaktion. Hierfür wurde die Membran zunächst eine Stunde in Blockierlösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken, anschließend dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit primärem Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das Protein und wurde meist im Verhältnis 1:1.000 in BSA-PBST verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran noch eine Stunde bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, bevor durch dreimaliges Waschen mit PBST unspezifisch gebundene Antikörper entfernt wurden und die Membran eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch am primären Antikörper und ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:5.000 in der Blockierlösung verdünnt. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zuerst eine Stunde mit PBST und dann einmal kurz mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Detektion der HRP mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die beiden Lösungen des ECL-Systems wurden laut Packungsangabe miteinander vermischt, die Membran mit 1 ml dieser Mischung bedeckt und 5 min bei RT inkubiert. Von der HRP wird in der ECL-Lösung eine Reaktion katalysiert, die zur Freisetzung von Chemilumineszenz führt. Die Lichtsignale können mit einem Autoradiographiefilm detektiert werden. Hierzu wurde die Membran in einer Klarsichtfolie in eine Filmkassette gelegt und ein Hyperfilm ECLTM je nach Intensität des Signals für wenige Sekunden bis zu maximal 60 min aufgelegt. Nach dem Entwickeln des Films war das über den Antikörper nachgewiesene Protein als dunkle Bande auf dem Film zu erkennen.

2.2.4.6 Coomassie-Färbung

Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran konnten diese mit einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Coomassie ist ein Farbstoff, der unter Ausbildung eines blauen Komplexes unspezifisch an alle Proteine auf der Membran bindet. Für die Färbung wurde die Membran nach der Elektrophorese 15 min in Wasser gewaschen

und dann in Biosafe™ Coomassie (BIORAD) inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach der Färbung wurde die Membran in Wasser gewaschen und auf einem Filterpapier getrocknet.

2.2.4.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können gelöste Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Das Nachweisprinzip des ELISA beruht, analog zum Western Blotting, auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Das Protein wird zunächst über einen am Plattenboden gebundenen Antikörper (Capture AK) immobilisiert und anschließend mit einem zweiten Antikörper (Detection AK) detektiert. Der zweite Antikörper wird über eine spezifische Interaktion an ein Enzym gekoppelt, welches ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Diese Art des ELISA wird als Sandwich-ELISA bezeichnet. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch nachgewiesen werden. Über eine Standardkurve läßt sich somit die Proteinkonzentration der Probe berechnen.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ELISA wurden entsprechend den Angaben der Hersteller zur Quantifizierung gelöster Proteine in Zellkulturüberständen bzw. in humanen Serumproben verwendet. Die Verdünnung der Proben wurde, sofern vom Hersteller nicht angegeben, empirisch ermittelt.

2.2.4.8 Bestimmung des Zelltodes

Eine mögliche zytotoxische Wirkung der AOX1 siRNA auf 3T3-L1 Zellen wurde in dieser Arbeit mit dem Cytotoxicity Detection Kit von Roche untersucht. Der Kit ermöglicht einen enzymgekoppelten colorimetrischen Nachweis der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in den Zellkulturüberständen. Die Lactat-Dehydrogenase ist ein sehr stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in Folge des Zelltodes in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. Die gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand korreliert somit direkt mit der Anzahl der abgestorbenen Zellen.

Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen, abzentrifugiert und unmittelbar für den LDH-Nachweis eingesetzt. Hierfür wurden die Überstände 1:10 mit dem jeweilig verwendeten Kulturmedium verdünnt, auf einer 96-Loch-Platte ausgebracht und mit den Reaktionskomponenten NAD^+ , Katalyst und dem Farbstoff Tetrazolium laut Protokoll des Herstellers versetzt. Als Negativkontrolle diente das Kulturmedium. Während einer

30 minütigen Inkubation bei RT unter Lichtabschluss setzt die LDH das ebenfalls im Überstand enthaltene Lactat zu Pyruvat um, wobei gleichzeitig NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Der Katalyst schließlich setzt in einer zweiten Reaktion den schwach gelben Farbstoff Tetrazolium unter Verbrauch des in der ersten Reaktion gebildeten NADH/H^+ in den roten Farbstoff Formazan um, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden kann.

2.2.4.9 Oil Red O Färbung

Zahl und Größe der Lipidtropfen in 3T3-L1 Adipozyten ließen einen Rückschluss auf den Differenzierungsgrad zu und wurden mittels Oil Red O Färbung analysiert. Hierfür wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min bei RT mit 10 %igem Formaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 60 %igem Isopropanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und dann 20 min mit Oil Red O Färbelösung inkubiert. Nach Abnahme der Färbelösung und intensivem Spülen mit Wasser, wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und ggf. fotografiert, wobei die Lipidtröpfchen an ihrer leuchtend roten Färbung zu erkennen sind.

2.2.4.10 Immunhistochemische Färbung

Der Nachweis des Expressionsmusters der AOX1 im humanen Fettgewebe erfolgte über eine indirekte immunhistochemische Färbung nach der Polymermethode unter Verwendung des Envision+ Kits von Dako. Bei der immunhistochemischen Färbung wird das Protein über einen primären Antikörper und einen nachfolgenden durch einen Sekundärantikörper vermittelten Detektionskomplex unmittelbar im Gewebe nachgewiesen. So kann die Expression des Protein in verschiedenen Zelltypen eines Gewebes erfasst und z.T. die Lokalisation des Proteins in der Zelle detektiert werden.

Für die immunhistochemische Färbung wurden kleine flache subkutane und viszerale Fettgewebstücke 24 h in 10%igen Formaldehyd in PBS fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zunächst 30 min bei 72°C inkubiert, um das Paraffin abzuschmelzen, und dann in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in der Mikrowelle bei 250 W in 50 mM Citratpuffer pH 7,1 für 30 min einer hitzeinduzierten Antigendemaskierung unterzogen. Nach Abkühlen auf RT wurden die Schnitte in Shandon Coverplate Halterungen (Thermo) eingespannt und hier zunächst mit

Waschpuffer gewaschen, dann mit PeroxidaseBlock inkubiert, nochmals gewaschen und 30 min bei RT mit einer 1:50 Verdünnung des AOX1 Antikörpers in AntibodyDiluent inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nochmals gewaschen, 30 min bei RT mit HRP- Polymerkonjugat gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert, nochmals gewaschen und 10 min in DAB+Chromogen in HRP SubstrateBuffer inkubiert. Bei diesem Schritt findet die durch die HRP katalysierte Farbreaktion statt und an den durch die Antikörperreaktion detektierten Epitopen lagert sich ein brauner Farbniederschlag ab. Zuletzt wurden die Gewebsschnitte nochmals kurz mit Wasser gespült und mit Hämatoxylin und Eosin Zellkerne und Zytoplasma gegengefärbt. Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen und mit Entalan eingedeckt. Die eingedeckten gefärbten Gewebsschnitte wurden zwei Tage bei RT getrocknet und dann unter einem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Als Positivkontrolle dienten unter den gleichen Bedingungen gefärbte humane Lebergewebsschnitte, als Negativkontrolle Schnitte humanen Fettgewebes und Lebergewebes, die ohne primären Antikörper gefärbt wurden.

Die Färbungen wurden unter Anleitung von Rudolf Jung am Institut für Pathologie durchgeführt, und von Prof. Dr. Arndt Hartmann (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) beurteilt.

2.2.4.11 In vitro Translation

Die über PCR amplifizierte Omentin cDNA wurde zur in vitro Translation des Omentin Proteins in den pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA Expressionsvektor eingebracht und in das *TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System* von Promega eingesetzt. Der Vektor besitzt eine MCS, der ein T7 Promotor vorgeschaltet ist. Das im Kit enthaltene Retikulozytenlysat beinhaltet alle für die Transkription der mRNA und deren Translation in Protein benötigten Komponenten. Das in vitro translatierte Omentin Protein wurde für Western Blot Analysen verwendet.

2.2.5 Rekombinante Expression von Omentin in H5 Insektenzellen

2.2.5.1 Expression rekombinanter Proteine im Bakulovirus Expressionssystem

Das Bakulovirus Expressionssystem ist ein sehr effizientes eukaryotisches Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter Proteine. Grundlage dieses Expressionssystems ist die Infektion von Insektenzellen, in dieser Arbeit Sf21- und H5-Zellen, mit rekombinanten Bakuloviren.

Die Bakuloviren gehören zu einer Gruppe diverser Viren, der *Baculoviridae*, die sich in verschiedenen Insektenarten vermehren. Das am häufigsten zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen eingesetzte Virus ist das *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV). Das AcNPV-Genom, ein etwa 130 kb großes zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül, enthält Gene, die für die Replikation des Virus in der Zellkultur nicht notwendig sind und daher durch heterologe Gene ersetzt werden können. Eines dieser Gene ist das Polyhedrin-Gen. Es wird während der späten Phase der Infektion sehr stark exprimiert und kodiert für das Polyhedrin-Protein, das die neugebildeten Viren nach der Freisetzung vor Umwelteinflüssen schützt. Das Polyhedrin-Protein kann bis zu 50% des Gesamtproteins einer infizierten Zelle einnehmen.

Das Polyhedrin-Gen kann deletiert und an seiner Stelle die cDNA des Zielgens in das AcNPV-Genom insertiert werden. Dies hat den Vorteil, dass das heterologe Gen zugleich unter die Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors gestellt wird. Neben der hohen Ausbeute an rekombinantem Protein gibt es noch weitere Vorteile dieses Expressionssystems. So werden rekombinante Proteine mit einem Signalpeptid in den Zellüberstand sezerniert, aus dem sie relativ leicht aufgereinigt werden können. Im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen werden rekombinante eukaryotische Proteine in den Insektenzellen zudem mit den meisten ihrer spezifischen posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Isoprenylierungen und Carboxymethylierungen versehen. Diese Modifizierungen können für die spätere Funktionalität des Proteins von großer Bedeutung sein.

2.2.5.2 Klonierung der Omentin cDNA in den pLP-BacPak9 Expressionsvektor

Für die Synthese der Omentin cDNA wurden 2 µg mRNA aus humanen Fettgewebe (s. 2.1.10) unter Verwendung von Oligo-dT Primern in einer Reversen Transkription (s. 2.2.3.3) eingesetzt. Die erhaltene Omentin cDNA wurde anschließend in einer PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primern Omentin_uni und Omentin_rev (s. 2.1.12.1)

amplifiziert und das erhaltene 964 bp lange Fragment über die in den Primersequenzen erhaltenen Schnittstellen *BamH* I und *Xba* I in frame in die MCS des pDNR-Dual Donor Vektor kloniert. Da der pDNR-Dual Donor Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen zur positiven Selektion aufweist, konnten nach der Transformation plasmidtragende Klone leicht durch ihr Wachstum auf ampicillinhaltigen LB- Agarplatten identifiziert werden. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Restriktionsenzymanalysen und Analyse der DNA-Sequenz verifiziert.

Aus dem pDNR-Dual Vektor wurde die Omentin cDNA zusammen mit den nachfolgenden Sequenzen für einen C-terminalen 6 x HN-Tag und einer Chloramphenicolresistenz über die beiderseits flankierenden loxP-Elemente mittels des Cre-loxP Transfersystems (s. 2.2.2.8) in den pLP-BacPak9 Expressionsvektor übertragen. *E.coli* Zellen wurden mit dem generierten Vektor transformiert und auf selektiven LB-Chloramphenicol-Sucrose-Agarplatten ausplattiert. Das Levanase kodierende SacB-Gen des pDNR-Dual Donor Vektors ermöglichte eine negative Selektion mit Sucrose. Klone mit dem parental Donor Vektor konnten nicht wachsen, da das vom SacB-Gen exprimierte Enzym Levanase die Umsetzung der Sucrose zu dem toxischen Metaboliten Levan katalysiert. Zugleich konnten über die positive Selektion mit Chloramphenicol nur Klone wachsen, die das Chloramphenicolresistenzgen durch den Transfer des Inserts erhalten hatten. Diese zweifache Selektion mit Chloramphenicol und Sucrose garantierte, dass über 90% der Kolonien den rekombinanten Expressionsvektor trugen. Klone mit dem korrekten Insert im Expressionsvektor wurden anschließend in Restriktionsenzymanalysen verifiziert.

2.2.5.3 Generierung rekombinanter Bakuloviren

Zur Generierung der rekombinanten Bakuloviren wurde das BacPakTM Baculovirus Expression System von BD Biosciences verwendet.

Sf21-Zellen wurden mit BacPAK6 viraler DNA und dem pLP-BacPak9-Expressionsvektor, der die cDNA des Zielgens enthielt, kotransfiziert. Die virale DNA enthält eine Deletion, die das Polyhedrin-Gen sowie den benachbarten ORF 1629 umfasst. Da der ORF 1629 ein für die Replikation des Virus essentielles Gen kodiert, ist diese virale DNA für sich in den Insektenzellen nicht vermehrungsfähig. Der Expressionsvektor besitzt einen Origin of Replication und ein Ampicillinresistenzgen für seine Propagation in *E.coli* sowie den Polyhedrin-Promotor und die klonierte cDNA des Zielgens. Der Promotor und das Zielgen sind auf beiden Seiten von Sequenzen des Virus-Genoms flankiert, die unter anderem auch

den ORF 1629 enthalten. Bei einer Kotransfektion der Virus-DNA und des Plasmids kann zwischen der Virus-DNA und den korrespondierenden viralen Sequenzen im Plasmid eine homologe Rekombination stattfinden, und so der Polyhedrin-Promotor, das Zielgen sowie der ORF 1629 vom Expressionsvektor auf die virale DNA übertragen werden. Allein die rekombinante Viren-DNA ist in der Lage, in den Insektenzellen funktionelle Virenpartikel herzustellen. Daher sollten alle generierten Viren in ihrem Genom das Zielgen an Stelle des Polyhedrin-Gens tragen.

Der Kotransfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

BacPAK6 virale DNA, 20 ng/μl	5	μl
pLP-BacPak9 mit Omentin cDNA-Insert, 380 ng/μl	1,3	μl
Bacfectin	4	μl
ddH ₂ O, steril	89,7	μl

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und dann unter Schwenken der Zellkulturschale tropfenweise auf 1×10^6 Sf21-Zellen gegeben. Da Serumkomponenten die Kotransfektion stören, wurden die Zellen während der Kotransfektion in 1,5 ml serumfreiem SF900-Medium gehalten. Nach 5 h serumfreier Inkubation mit dem Kotransfektionsansatz bei 27°C wurden 1,5 ml BacPAK Complete Medium zugesetzt und die Zellen für weitere 72 h bei 27°C inkubiert. Nach dieser Zeit zeigten die Zellen die phänotypischen Merkmale einer Infektion: die infizierten Zellen waren größer, besaßen dunkle Einschlüsse und lösten sich leicht vom Boden der Zellkulturflasche ab. Der Zellüberstand mit den rekombinanten Viren wurde abgenommen, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert. Der Überstand wurde zur Infektion von H5-Zellen verwendet, um zunächst die rekombinanten Viren zu vermehren. Die weiteren Überstände wurden dann zur Expression des rekombinanten Omentin in H5-Zellen eingesetzt. Die Sf21-Zellen der Kotransfektion wurden ebenfalls abgenommen, einmal mit PBS gewaschen, in RIPA-Puffer aufgenommen und mittels Western-Blotting analysiert.

2.2.5.4 Infektion von Insektenzellen

Die Infektion von Insektenzellen mit den rekombinanten Bakuloviren wurde sowohl zur Vermehrung der Viren als auch zur Expression des rekombinanten Proteins durchgeführt. Für die Infektion wurden H5 Zellen verwendet, die sich in serumfreiem Express Five™ Medium kultivieren lassen. Dies erleichterte die anschließende Reinigung des sezernierten rekombinanten Proteins aus dem Kulturmedium.

Die optimale Menge zur Infektion der Insektenzellen wurde für jeden infektiösen Überstand empirisch ermittelt und über ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Für die Infektion wurden $2,5 \times 10^7$ H5 Zellen in 10 ml Express Five™ Medium in einer Zellkulturflasche ausgesät und mit 100-1000 µl eines Virenüberstands infiziert. Die infizierten Zellen wurden 4 Tage bei 27°C kultiviert. Anschließend wurde der Überstand über den Zellen abgenommen und abzentrifugiert (300 g, 5 min). Ein Aliquot des Überstands wurde für weitere Infektionsreihen bei 4°C unter Lichtabschluss aufbewahrt. Der Großteil der Überstände wurde jedoch für die Reinigung des rekombinanten Proteins verwendet und daher zur Inaktivierung von Proteasen mit EDTA-freiem Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche) versetzt und bis zur Reinigung bei -80°C gelagert. Die infizierten Zellen wurden ebenfalls abgenommen, einmal mit PBS gewaschen, in RIPA-Puffer aufgenommen und die Expression des rekombinanten Proteins mittels Western-Blotting oder Coomassie-Färbung nachgewiesen.

2.2.5.5 Reinigung des rekombinanten Omentin

Das rekombinante Omentin konnte an Hand seines C-terminalen 6 x HN-Tag aus dem Zellkulturüberstand affinitätsgereinigt werden. Für die Reinigung wurde BD TALON™ Purification Kit (BD Biosciences) verwendet.

H5 Zellen wurden mit dem rekombinanten Bakulovirus infiziert und 4 Tage bei 27°C im Brutschrank kultiviert. Das produzierte rekombinante Omentin wurde von den Zellen aufgrund seines natürlichen Signalpeptids in das Kulturmedium sezerniert, aus dem es mit Hilfe seines C-terminal fusionierten 6 x HN-Tags über eine Affinitätssäule gereinigt werden konnte. Die Affinitätsreinigung beruhte auf dem Prinzip der Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). Hierbei binden die Histidin-Seitenketten des 6 x HN-Tags reversibel an die immobilisierten Co^{2+} -Ionen des TALON™ Metal Affinity Resins. Da Imidazol mit den Histidin-Seitenketten kompetitiv um die Bindungsstellen an den Co^{2+} -Ionen konkurriert, kann das Protein nach mehreren Waschschritten unter nativen Bedingungen mit einem Imidazolhaltigen Puffer von der Säulenmatrix eluiert werden.

Vier Tage nach der Infektion der Zellen mit rekombinanten Bakuloviren wurden die Überstände abgenommen, abzentrifugiert (300 g, 5 min) und mit EDTA-freiem Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche) versetzt. Um die Salzkonzentration des Kulturmediums zu reduzieren, wurden die Überstände über Nacht bei 4°C unter einmaligen Pufferwechsel gegen PBS dialysiert. Anschließend wurden mögliche Präzipitate aus den

Überständen durch Filtration entfernt. Je 50 ml der dialysierten und filtrierten Überstände wurden zu 500 µl Resin gegeben, das zuvor einmal mit 500 µl und einmal mit 900 µl Äquilibrierungspuffer (BD TALON™ Buffer Kit von BD Biosciences) gewaschen (700 g, 2 min) worden war. Überstände und Resin wurden zusammen 3 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Resin abzentrifugiert (700 g, 5 min) und in 900 µl Äquilibrierungspuffer mit 0,5% Tween®20 auf ein Minisäulchen (Hanndee™ Mini-Spin Column) aufgebracht. Nachdem sich das Resin in der Säule abgesetzt hatte, wurde es mit 6 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen, der mit 0,5% Tween®20 und 1 mM Imidazol versetzt war. Der Zusatz von Tween®20 und Imidazol im Waschpuffer löste unspezifisch gebundene Proteine von der Resin-Matrix und verringerte somit die Verunreinigung des rekombinanten Proteins mit anderen Proteinen. Das Resin wurde noch einmal mit 1 ml Äquilibrierungspuffer supplementiert mit 0,5% Tween®20 gewaschen, bevor das Omentin Protein in fünf Fraktionen mit je 210 µl Elutionspuffer (BD TALON™ Buffer Kit), der 150 mM Imidazol enthielt, von der Matrix eluiert wurde.

Von den Fraktionen wurden je 10 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Protein durch Silberfärbung nachgewiesen. Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten, wurden vereinigt, bei 4°C 1 h gegen PBS dialysiert, um das Imidazol zu entfernen, sterilfiltriert, einer Proteinbestimmung unterzogen, portioniert und bei -80°C aufbewahrt. Noch verunreinigte Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert, um dann nochmals einer Reinigung unterzogen zu werden.

2.2.6 Expressionsanalyse mit Affymetrix GeneChip®

Die Veränderung der Genexpression in primären humanen Hepatozyten dreier Spender in Abhängigkeit von einer Stimulierung mit rekombinanten humanen Chemerin, Galectin 3 bzw. Omentin wurde mit dem GeneChip® von Affymetrix analysiert.

Hierfür wurden je 1 Million primäre humane Hepatozyten für 24 h mit 40 ng/ml rekombinanten humanen Chemerin, 10 ng/ml rekombinanten humanen Galectin 3 bzw. 300 ng/ml rekombinanten humanen Omentin stimuliert. Als Kontrolle dienten mit dem entsprechenden für die Proteine verwendeten Lösungsmittel inkubierte primäre humane Hepatozyten. Nach der Stimulation wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und 1 µg RNA an das Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik (Regensburg) zur Hybridisierung von Affymetrix Human Genome U133_Plus2.0 Arrays gesandt.

Der Auswertung konnten die durch die Inkubation mit rekombinanten humanen Chemerin, Galectin 3 bzw. Omentin induzierten bzw. reprimierten Gene entnommen werden. Insgesamt wurden 55.000 Gensonden untersucht. Kandidaten für eine Regulation wurden mittels Real-Time RT-PCR auf RNA-Ebene und/oder mittels Western-Blotting auf Proteinebene untersucht.

2.2.7 Tiermodelle

Zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen in Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Spezies sowie den Einfluss von Adipositas bzw. Typ 2 Diabetes auf die Expression bestimmter Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Nagetiermodelle verwendet, und zwar normalgewichtige C57BL/6 Mäuse, mit Standard- bzw. Hochfettdiät gefütterte Wistar Ratten sowie nicht-diabetische und diabetische Zuckerratten [206].

2.2.7.1 Mäuse

Der durch Inzucht erzeugte Mausstamm C57BL/6 zeichnet sich durch seine Neigung aus, auf Hochfettdiät ein Metabolisches Syndrom sowie einen Insulin-unabhängigen Diabetes zu entwickeln. Dies lässt sich durch eine verminderte Leptinsensitivität im Vergleich zu anderen Mausstämmen erklären. Daher wird dieser Mausstamm oft als Tiermodell für die Untersuchung der Adipositas und des Typ 2 Diabetes mellitus verwendet [207, 208].

Subkutanen und viszerales (hier: omentales) Fettgewebe von 12 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen auf Standarddiät wurde von Dr. Elke Eggenhofer (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) bereitgestellt. Das Fettgewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolation von Protein bei -80°C gelagert.

2.2.7.2 Hochfettratten

Männliche Wistar Ratten wurden zur Induktion eines Metabolischen Syndroms ab der sechsten Lebenswoche für 12 Wochen auf verschiedenen Hochfettdiäten gehalten [209, 210]. Die Hochfettdiäten enthielten einen erhöhten Fettanteil von 42% der zugeführten Energie, wobei die Diät (Charles River) entweder auf Schweineschmalz (HF), auf Olivenöl (OF) oder auf Kokosnussfett (KF) basierte. Die entsprechenden Kontrolltiere erhielten unter den gleichen Versuchsbedingungen eine Standarddiät (ST) mit einem Fettanteil von 12 %

basierend auf Schweineschmalz (Charles River). Die Tiere wurden für 12 Wochen auf den Diäten gehalten, anschließend Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen und das viszerale (hier: omentale) Fettgewebe zur Isolation von RNA und Protein entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Serum wurde bei -20°C , das Fettgewebe bei -80°C gelagert. Das Gesamtkörpergewicht der Tiere auf Hochfettdiät lag am Versuchsende $20 \pm 11\%$ (HF), $14 \pm 11\%$ (OF) bzw. $9 \pm 8\%$ (KF) über dem der Kontrolltiere (ST). Gesättigte Fettsäuren waren signifikant erhöht im Serum der Tiere auf Hochfettdiät basierend auf Kokosnussfett (KF), einfach ungesättigte Fettsäuren im Serum der Tiere auf Hochfettdiät basierend auf Olivenöl (OF) bzw. Kokosnussfett (KF), und mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Serum aller Tiere auf Hochfettdiät verglichen mit den Tieren auf Standarddiät (ST). Die insulininduzierte Glukoseaufnahme war nur bei den Tieren auf Schweineschmalz- und Olivenöldiät (HF und OF) signifikant vermindert [210]. Die Tierversuche wurden von PD. Dr. Roland Büttner und PD. Dr. Cornelius Bollheimer (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) entsprechend den ethischen Richtlinien des Universitätsklinikums Regensburg und mit Genehmigung der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt [210].

2.2.7.3 Zuckerratten

Männliche homozygote Zuckerratten (*fa/fa*) und entsprechende männliche heterozygote Zuckerratten (*fa/-*) wurden als monogenetisches Modell des Typ 2 Diabetes mellitus verwendet. Homozygote Zuckerratten (*fa/fa*) besitzen eine spontane autosomal rezessive Mutation in der extrazellulären Domäne des Leptin-Rezeptors („*fa*“-Mutation). Diese Punktmutation führt zu Hyperphagie, Hyperlipidämie, Insulinresistenz und Hyperglykämie, während die heterozygoten Kontrolltiere unter identischen Fütterungsbedingungen normalgewichtig und normalglykämisch bleiben [211, 212].

Die Ratten wurden ab der fünften Lebenswoche 20 Wochen lang mit einer besonders energiereichen Diät ernährt (Purina 5008, Protein 23%, Fett 6.5%, Kohlehydrate 58.5%, Ballaststoffe 4% und Asche 8%, Charles River). Homozygote Zucker-Ratten (*fa/fa*) entwickelten während dieser Zeit spontan eine Form des insulinunabhängigen Diabetes. Nach Versuchsende wurde Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen, sowie subkutanes und viszerale (hier: retroperitoneales) Fettgewebe zur Isolation von RNA und Protein entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Serum wurde bei -20°C , das Fettgewebe bei -80°C gelagert. Das Körpergewicht der diabetischen Zuckerratten (ZDF)

war am Versuchsende gegenüber den schlanken Kontrolltiere (ZDL) nicht signifikant erhöht (392 ± 9 g in *fa/fa* zu 362 ± 7 g in *fa/-*), jedoch war der Blutzucker fast fünfmal so hoch wie in den Kontrolltieren (390 ± 71 mg/dl in *fa/fa* zu 79 ± 15 in *fa/-*, $p < 0,001$).

Die Tierversuche wurden von Prof. Dr. Andreas Luchner (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg) entsprechend den ethischen Richtlinien des Universitätsklinikums Regensburg und mit Genehmigung der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt [213, 214].

2.2.8 Humane Proben

2.2.8.1 Humane Serumproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Serumproben wurden im Zeitraum von 2005 bis 2009 in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Schäffler, PD Dr. Reiner Wiest (beide Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) und PD Dr. Stefan Farkas (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) unter Mitarbeit von Dr. cand. med. Margarita Bala und Dipl. Biol. Andrea Kopp, sowie von Dr. Markus Neumeier, Dipl. Biol. Sabine Abke, Dr. med. Sylvia Wurm und Dres. cand. med. Franziska Schober, Daniela Sporrer und Markus Weber (alle Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) gesammelt. Das Studienprotokoll wurde durch die örtliche Ethikkommission bewilligt und wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (The World Medical Association: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) durchgeführt. Alle Spender wurden vor dem Eingriff durch einen Arzt über die Studie und Probenentnahme sowie damit verbundene mögliche Risiken aufgeklärt, und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

Typ 2 Diabetikern sowie normalgewichtigen und übergewichtigen gesunden Probanden wurde systemisch venöses Blut entnommen. Für die Untersuchung des Beitrages des viszeralen Fettgewebes zu systemischen Adipozytokinmenge wurde portalvenöses, hepatisch venöses und systemisch venöses Blut von Patienten asserviert, welchen in Folge einer Leberzirrhose ein transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt (TIPS) implantiert wurde bzw. welche sich aufgrund anderer nicht leberbedingter Erkrankungen einer Operation an der Leber unterziehen mussten.

Das venöse Blut wurde den Probanden im nüchternen Zustand mit Hilfe von EDTA Serumröhrchen abgenommen, abzentrifugiert und das gewonnene Serum zur Messung

allgemeiner klinisch-chemischer Parameter und Adipozytokine verwendet. Die Lagerung der Seren erfolgte portioniert bei -20°C.

2.2.8.2 Humane Fettgewebsproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Kooperation mit Dr. Andreas Schnitzbauer und Dr. Aiman Obed (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) gepaarte Proben abdominalen subkutanen und viszeralen (hier: omentalen) Fettgewebes von neunzehn Patienten asserviert, die sich aus verschiedenen Gründen einer Operation im Bauchraum unterziehen mussten. Zwölf der Spender waren Männer, sieben Frauen. Das Durchschnittsalter der Spender lag bei 57 Jahren, der durchschnittliche BMI betrug $26,0 \pm 3,1$. Eine Übersicht der Spenderdaten ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Das Studienprotokoll wurde durch die örtliche Ethikkommission bewilligt und wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (The World Medical Association: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) durchgeführt. Alle Spender wurden vor dem Eingriff durch einen Arzt über die Studie, Probenentnahme sowie etwaige damit verbundene Risiken aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung.

Die Gewebsproben wurden unmittelbar nach der Entnahme kurz in sterilem eiskalten PBS gespült, Bindegewebe und größere Blutgefäße entfernt, und in kleinere Stücke zerteilt. Für die spätere Isolation von RNA wurden Gewebsstücke in RNAlater Reagenz aufgenommen bzw. für eine spätere Isolation von Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Proben wurden bei -80°C gelagert. Für immunhistologische Färbungen wurde ein flaches Stück Gewebe 24 h in 10% Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Diese Proben wurden lichtgeschützt bei RT aufbewahrt.

Isolation	Geschlecht	Alter	BMI	WHR	Adipositas	T2D	Diagnose
H630	weiblich	63	35,4	1,14	x		Hypernephrom
H631	männlich	52	25,4	1,08	x		Colon-Krazinom
H633	männlich	24	25,4	1,00	x		Leberzirrhose
H638	männlich	76	24,8	0,93			Caroli-Syndrom
H639	weiblich	67	23,2	1,05			Colon-Karzinom
H647	männlich	68	24,9	1,02		x	Hepatozelluläres Karzinom
H649	männlich	61	26,0	0,96	x		Colon-Karzinom
H658	männlich	65	24,2	1,07			Colon-Karzinom
H659	männlich	76	26,4	1,05	x		Hepatozelluläres Karzinom
H660	männlich	71	29,7	1,05	x		Klatskin
H664	männlich	61	28,3	1,05	x		Colon-Karzinom
H665	männlich	68	21,9	1,11			Colangionäres Karzinom
H681	männlich	60	23,1	1,02			Nierenzellkarzinom
n.v.	weiblich	48	n.v.	1,13	n.v.		Lebendleberspende
H769	weiblich	42	27,0	1,06	x		Fokal-noduläre Hyperplasie
H770	weiblich	62	25,6	1,11	x		Hepatozelluläres Karzinom
H774	weiblich	22	26,1	1,12	x		Adenom
H781	weiblich	27	n.v.	0,92	n.v.		Fokal-noduläre Hyperplasie
H783	männlich	61	24,4	0,99			Hepatozelluläres Karzinom

Tabelle 1: Daten der Spender, von welchen im Rahmen dieser Arbeit gepaarte subkutane und viszerale Fettproben asserviert wurden. Das Alter der Patienten ist in Jahren und der BMI in kg/m² angegeben. Adipositas wurde als BMI größer 25 kg/m² definiert. Eine WHR-Wert größer 0,85 für Frauen bzw. 1,00 für Männer ist als vermehrte Menge viszeralen Fettgewebes definiert [215].

2.2.9 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden in Microsoft Office Excel 2003 nach der Statistik des Student's t-test sowie in SPSS 15 mit Mann-Whitney-U-Test, Chi-Quadrat-Test und Pearson-Korrelation durchgeführt. Eine signifikante Änderung ($p < 0,05$) wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Diagramme wurden in SPSS 15 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Aldehydoxidase 1

Aldehydoxidase 1 (AOX1) ist ein homodimeres Enzym, das aus zwei identischen etwa 145 kDa großen Untereinheiten aufgebaut ist. Das Enzym liegt im Zytosol vor und ist in der Lage die Oxidation verschiedener Aldehyde und N-heterozyklischer Xenobiotika zu katalysieren [99]. Als Nebenprodukt werden bei den Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt [103]. Obwohl das natürliche Substrat und die physiologische Rolle der AOX1 bislang unbekannt sind, könnte sie somit signifikant zur endogenen ROS Produktion und zur Entstehung einer Adipositas assoziierten Insulinresistenz beitragen [21, 45, 100-104]. Vor einigen Jahren wurde in Genexpressionsanalysen des subkutanen und des viszeralen Fettgewebes nicht diabetischer, adipöser Männer zudem eine höhere Expression der AOX1 im viszeralen Fettgewebe beschrieben, eine Expression des Proteins im Fettgewebe oder in Adipozyten wurde jedoch noch nicht analysiert [105].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst eine depot- und zelltypspezifische Expression der Aldehydoxidase 1 im Fettgewebe untersucht und anschließend ihre Regulation und Funktion vor dem Hintergrund des Metabolischen Syndroms an Hand verschiedener Tier- und Zellkulturmodelle näher charakterisiert werden.

3.1.1 Expression der Aldehydoxidase 1 im Fettgewebe

3.1.1.1 Expression der Aldehydoxidase 1 im humanen Fettgewebe

Eine Analyse der mRNA Expression der AOX1 im humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebe von fünf Spendern (s. 2.2.8.2) mittels Real-Time RT-PCR bestätigte die in Genexpressionsanalysen beschriebene höhere Expression im viszeralen Fettgewebe [105]. Die mRNA Expression der AOX1 betrug im viszeralen Fettgewebe $3,87 \pm 2,77$ und im subkutanen Fettgewebe $1,23 \pm 1,05$ ($p = 0,031$) (Abb. 3A). Für die Normalisierung wurde die mRNA Expression der 18S rRNA verwendet, die mit $118,2 \pm 36,8$ im subkutanen und $124,4 \pm 38,9$ im viszeralen Fettgewebe keine differenzielle Expression in den beiden Fettgewebsdepots aufwies (nicht gezeigt) [216].

Auf Proteinebene ließ sich eine höhere Expression der AOX1 im viszeralen Fettgewebe nicht bestätigen. Insgesamt wurden die gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebeproben von zehn Spendern mittels Immunoblot analysiert. Als Ladungskontrolle

diente die Expression von β -Aktin. Eine gleichmäßige Beladung wurde zudem durch die Coomassie-Färbung der Membran überprüft. In Abbildung 3B ist exemplarisch die Expression des AOX1 Proteins in drei Spendern wiedergegeben. Die Expression war individuell sehr unterschiedlich und zeigte keine Präferenz für ein Fettgewebsdepot. Auch eine Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, Adipositas oder Diabeteserkrankung ließ sich nicht erkennen.

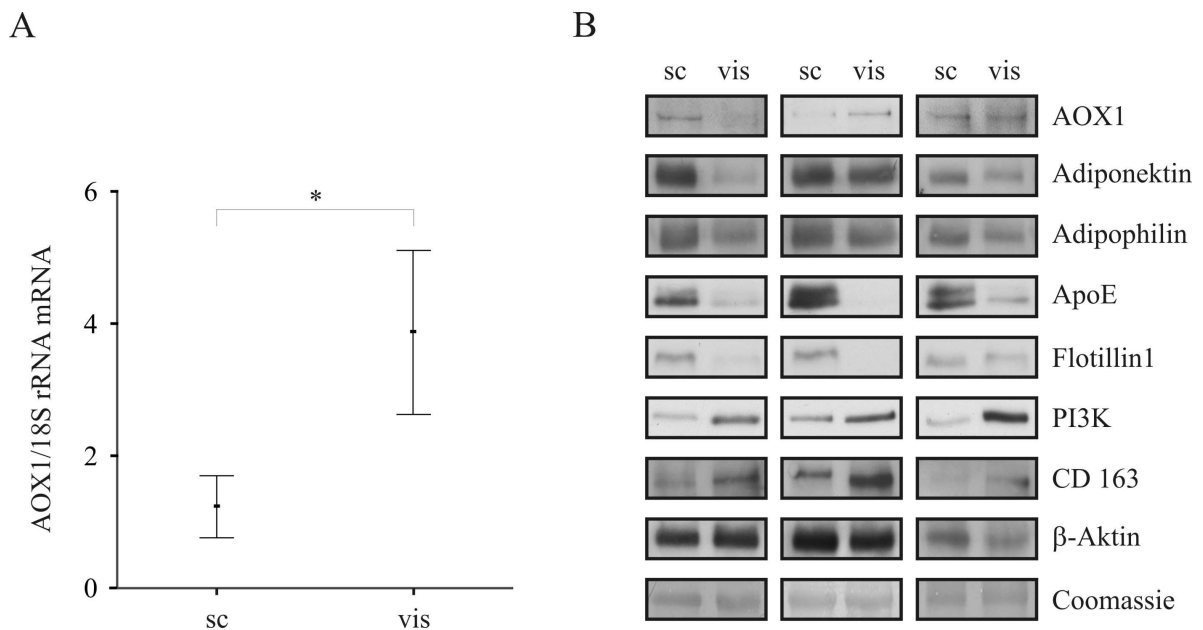


Abbildung 3: mRNA- und Proteinexpression der AOX1 in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes. (A) Bestimmung der AOX1 mRNA Expression mittels Real-Time RT-PCR im Fettgewebe von fünf Probanden. Die Normalisierung erfolgte mit 18S rRNA. (* $p = 0,031$) (B) Analyse der Proteinexpression von AOX1, Adiponektin, Adipophilin, ApoE, Flotillin 1, PI3K und CD163 mittels Immunoblot im Fettgewebe von drei Spendern. Die Expression von β -Aktin sowie die Färbung der Membran mit Coomassie bestätigen eine gleichmäßige Probenbeladung.

Neben der AOX1 wurde die Expression weiterer Proteine im subkutanen und viszeralen humanen Fettgewebe untersucht. Hier zeigte sich eine depotspezifische differenzielle Expression: Adiponektin, Adipophilin, Apolipoprotein E (ApoE) und Flotillin 1 wurden vermehrt im subkutanen Fettgewebe und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und CD163 vermehrt im viszeralen Fettgewebe exprimiert. Die Expressionsmuster stehen im Einklang mit der aktuellen Literatur und bestätigen die Expression weiterer im Rahmen dieser Arbeit analysierter Proteine.

Die höhere Expression von ApoE im subkutanen Fettgewebe deckt sich mit den signifikant höheren Mengen an Cholesterin, Triglyzeriden und Fettsäuren, die in den subkutanen

Fettgewebsproben detektiert wurden. So wurden im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe nur 52,0% der Menge an Cholesterin ($1,84 \pm 0,86$ gegen $3,53 \pm 1,68$ mg/mg Protein, $p = 0,01$), 78,4% der Menge an Triglyzeriden ($34,3 \pm 21,6$ gegen $43,8 \pm 28,8$ mg/mg Protein, $p = 0,03$) sowie 58,3% der Menge an Fettsäuren ($0,025 \pm 0,013$ gegen $0,042 \pm 0,015$ mM, $p = 0,01$) gemessen (Abb. 4).

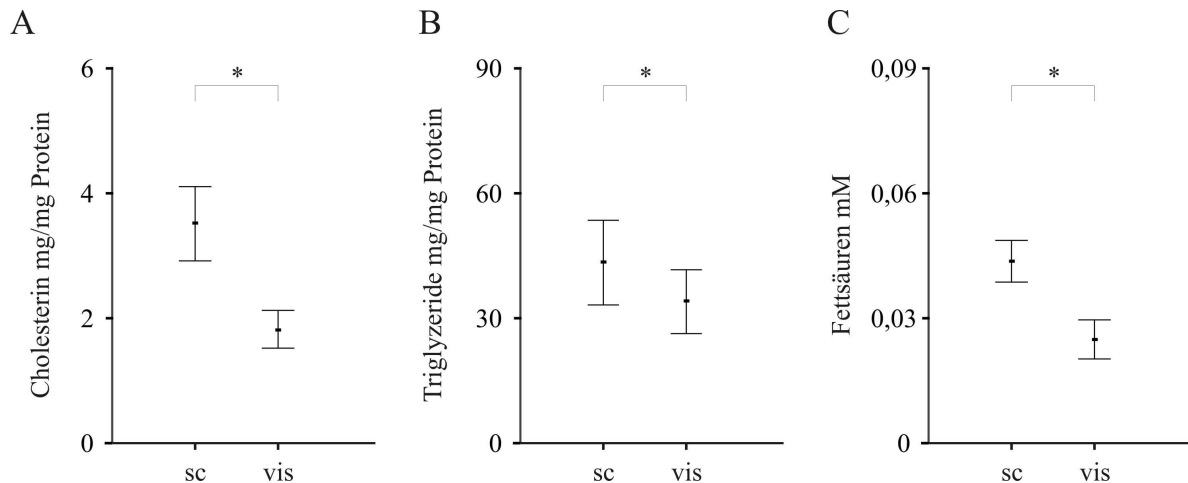


Abbildung 4: Cholesterin, Triglyzeride und Fettsäuren in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes. Bestimmung der Menge an Cholesterin (A), Triglyzeriden (B) und Fettsäuren (C) in den Fettgewebslysaten von acht Spendern. Die Werte für Cholesterin und Triglyzeride sind relativ zur Proteinkonzentration der Proben wiedergegeben. (* $p < 0,05$)

Da sich das Fettgewebe aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt, neben Präadipozyten und Adipozyten u.a. auch aus Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen, wurde eine immunhistologische Färbung des humanen Fettgewebe zur Bestimmung einer adipozytären Expression des AOX1 Proteins durchgeführt (s. 2.2.4.10). Während im subkutanen Fettgewebe des in Abbildung 5A gezeigten Spenders keine Färbung der AOX1 nachgewiesen werden konnte, zeigte sich im viszeralen Fettgewebe des gleichen Spenders eine Färbung der AOX1 im Zytoplasma von Adipozyten (Abb. 5B) und Mesothelzellen (Abb. 5C). Als Positivkontrolle wurde humanes Lebergewebe mitgefärbt, von welchem eine zytoplasmatische Expression der AOX1 bekannt ist [217].

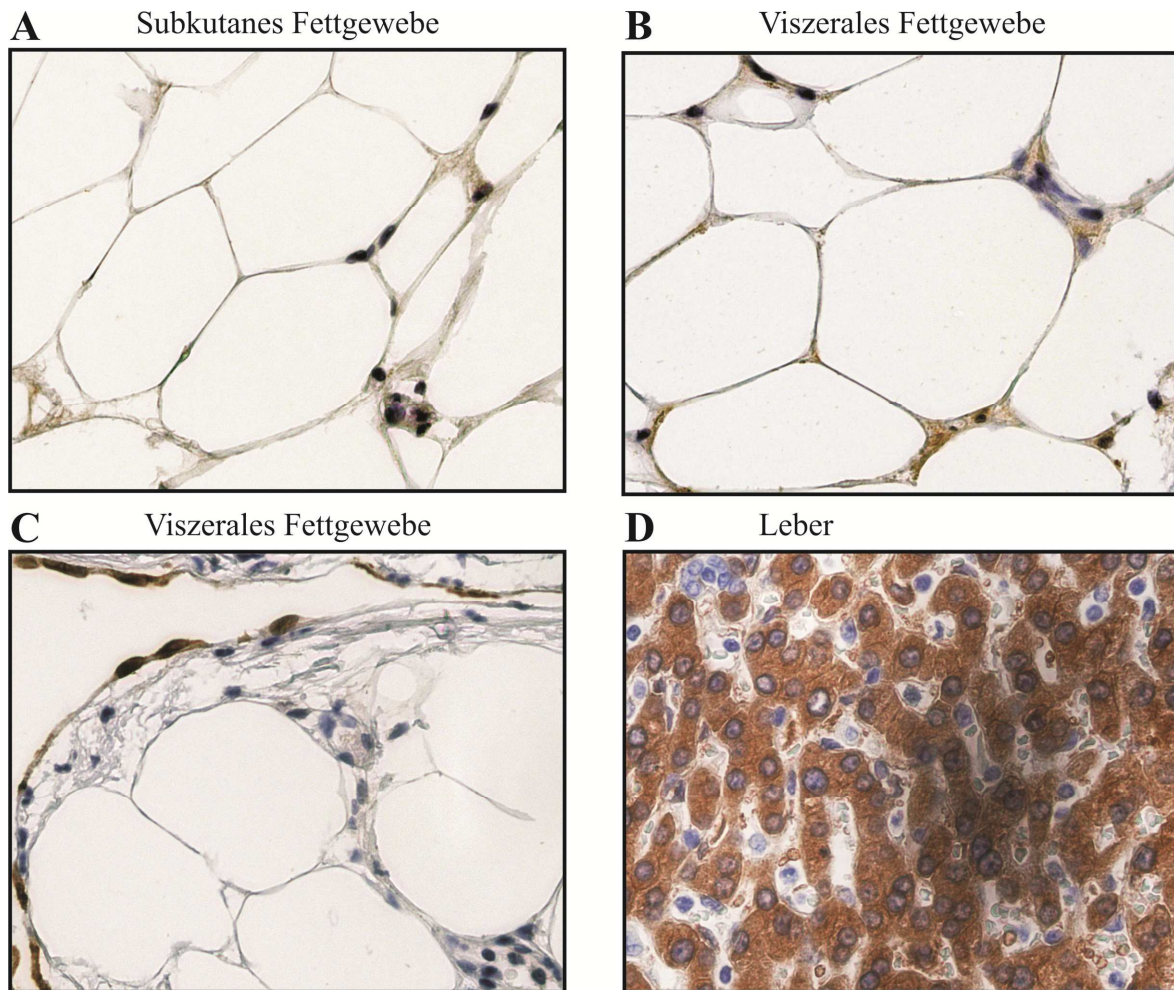


Abbildung 5: Immunhistologische Färbung humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes mit monoklonalen AOX1 Antikörper. (A) Färbung des subkutanen Fettgewebes. (B) Färbung des viszeralen Fettgewebes mit zytoplasmatischer Lokalisation der AOX1. (C) Färbung des viszeralen Fettgewebes mit Nachweis der AOX1 in Mesothelzellen. (D) Färbung humaner Leber als Positivkontrolle. (400fache Vergrößerung)

3.1.1.2 Expression der Aldehydoxidase 1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus

Eine Untersuchung der AOX1 Proteinexpression im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der C57BL/6 Maus (s. 2.2.7.1) zeigte keine konsistenten Ergebnisse. Dies könnte mit der zusätzlichen Expression dreier Homologe der AOX1 (*Aldehyde Oxidase Homologue 1-3*, AOH1-3) neben dem murinen AOX1 Orthologen in Nagetieren zusammenhängen [102]. Die Aminosäuresequenz dieser Proteine ist zu ca. 60% identisch. Zudem ist die gewebs- und zelltypspezifische Expression der verschiedenen Aldehydoxidasen hinsichtlich des Fettgewebes nicht hinreichend bekannt. Dies verhinderte einen eindeutigen immunochemischen Nachweis mit dem monoklonalen AOX1 Antikörper.

3.1.1.3 Expression der Aldehydoxidase 1 im viszeralem Fettgewebe der Hochfettratte

Für die Untersuchung des Einflusses einer nahrungsbedingten Adipositas auf die Expression der AOX1 wurde das Modell der Hochfettratte verwendet (s. 2.2.7.2). In männlichen Wistar Ratten wurde durch zwölfwöchige Fütterung einer Diät mit 42%igem Fettanteil basierend auf Schweineschmalz (HF), Kokosnussfett (KF) oder Olivenöl (OF) eine Adipositas induziert. Die Kontrolltiere erhielten unter gleichen Versuchsbedingungen eine Standarddiät (ST) mit einem Fettanteil von 12% basierend auf Schweineschmalz. Das Körpergewicht aller Tiere auf Hochfettdiät war signifikant erhöht, und Tiere auf Schweineschmalz- und Olivenöldiät (HF und OF) wiesen eine signifikant verminderte Insulinsensitivität auf [210].

Eine Analyse der mRNA Expression der AOX1 im viszeralem Fettgewebe dieser Tiere zeigte eine signifikant reduzierte Expression in den insulinresistenten HF- und OF- Ratten. Die Expression war in den HF- Ratten $0,18 \pm 0,04$ ($p = 0,001$) und in den OF- Ratten $0,37 \pm 0,08$ ($p = 0,006$), während die Expression in den ST- Ratten bei $0,60 \pm 0,08$ lag. Die Expression der AOX1 in den HF- Ratten und den OF- Ratten betrug somit nur 29,8% bzw. 62,0% der Expression in den mit Standarddiät gefütterten Kontrolltieren (Abb. 6A). Die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors PPAR γ zeigte eine ähnliche Regulation mit $0,87 \pm 0,23$ in den HF- Ratten ($p = 0,018$) und $0,65 \pm 0,08$ in den OF- Ratten ($p = 0,002$) entsprechend 68,6% bzw. 50,9% der Expression in den ST- Ratten mit $1,27 \pm 0,31$ (Abb. 6C). PPAR γ wird sehr stark im Fettgewebe exprimiert und kontrolliert dort die Adipogenese und die Insulinsensitivität [49]. Während die Rolle von PPAR γ im Fettgewebe intensiv untersucht wurde, liegen zur Funktion des Transkriptionsfaktors PPAR α im Fettgewebe kaum Daten vor. In Hepatozyten und der Leber wurde jedoch eine Reprimierung der Expression bzw. der Aktivität der AOX1 durch den PPAR α Agonisten Fenofibrat beschrieben [218, 219]. Durch die Hochfettdiät wurde die Expression von PPAR α im viszeralem Fettgewebe im Gegensatz zur Expression von PPAR γ aber nicht reguliert (Abb. 6B). Die Werte wurden gegen die Mittelwerte der drei Referenzgene β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und 18S rRNA in den entsprechenden Proben normalisiert, da nur der Quotient dieser Gene, nicht aber die einzelnen Gene, unter den Versuchsbedingungen keine Regulation zeigten (Abb. 6D).

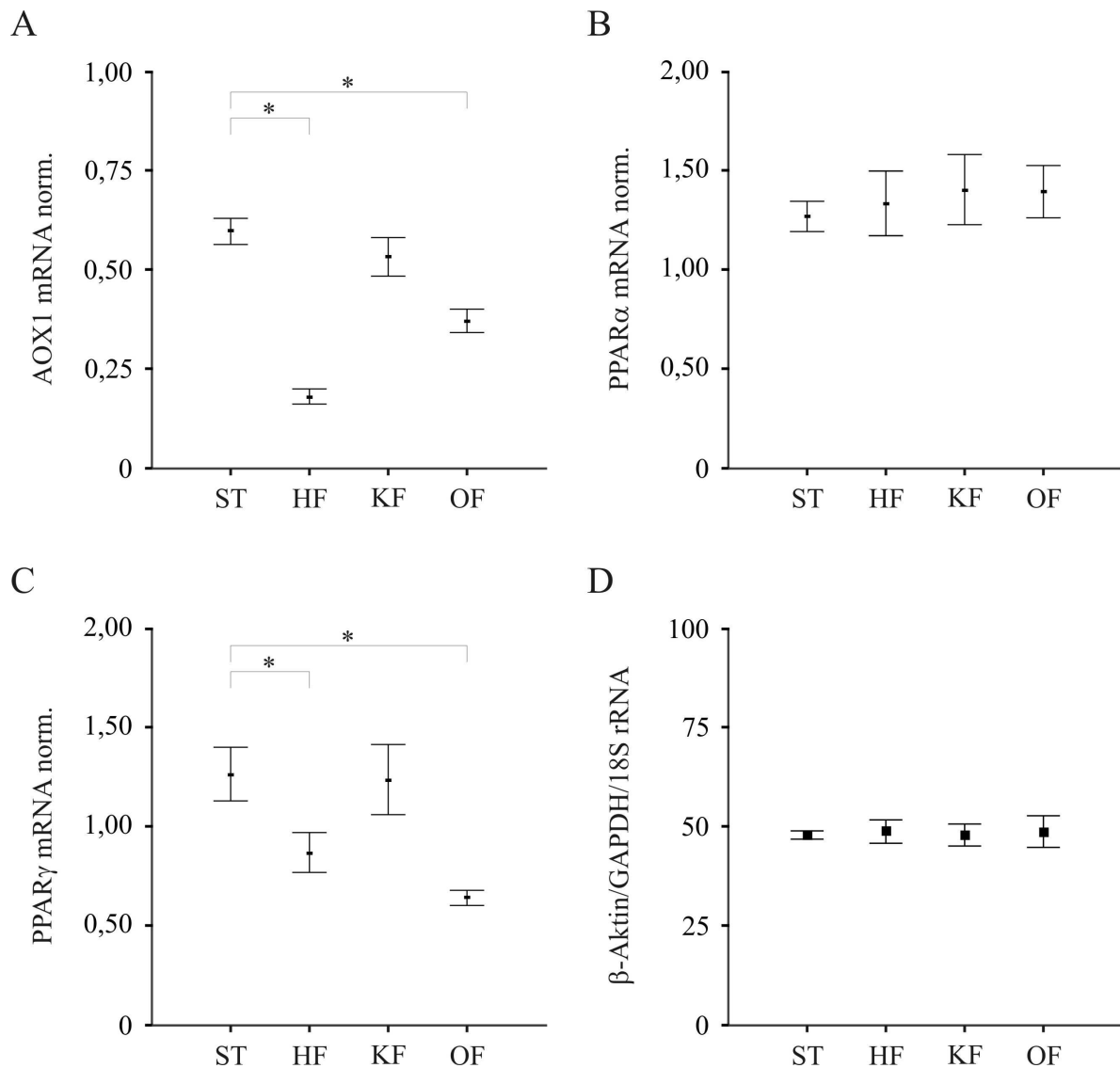


Abbildung 6: AOX1 (A), PPAR α (B) und PPAR γ (C) mRNA Expression im viszeralen Fett von Wistar Ratten auf Standarddiät (ST) oder auf Hochfett-diät basierend auf Schweineschmalz (HF), Kokosnussfett (KF) bzw. Olivenöl (OF). Die Werte wurden gegen die Mittelwerte der drei Referenzgene β -Aktin, GAPDH und 18S rRNA normalisiert (D). (n = 5) (* p < 0,05)

Ein immunchemischer Nachweis der AOX1 im viszeralen Fettgewebe der Hochfetttratten war ebenso wie im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der C57BL/6 Maus nicht möglich (s. 3.1.1.2).

3.1.1.4 Expression der Aldehydoxidase 1 im Fettgewebe der Zuckerratte

Eine mögliche veränderte Expression der AOX1 im Typ 2 Diabetes mellitus wurde mit Hilfe der Zuckerratte untersucht (s. 2.2.7.3). Männliche homozygote Zuckerratten (*fa/fa*) (ZDF) besitzen eine Mutation des Leptinrezeptors, der zur spontanen Ausbildung einer insulinunabhängigen Form des Diabetes mellitus mit Insulinresistenz und Hyperglykämie führt, während die heterozygoten Kontrolltiere (*fa/-*) (ZDL) unter identischen Versuchsbedingungen insulin sensitiv und normoglykämisch bleiben [211].

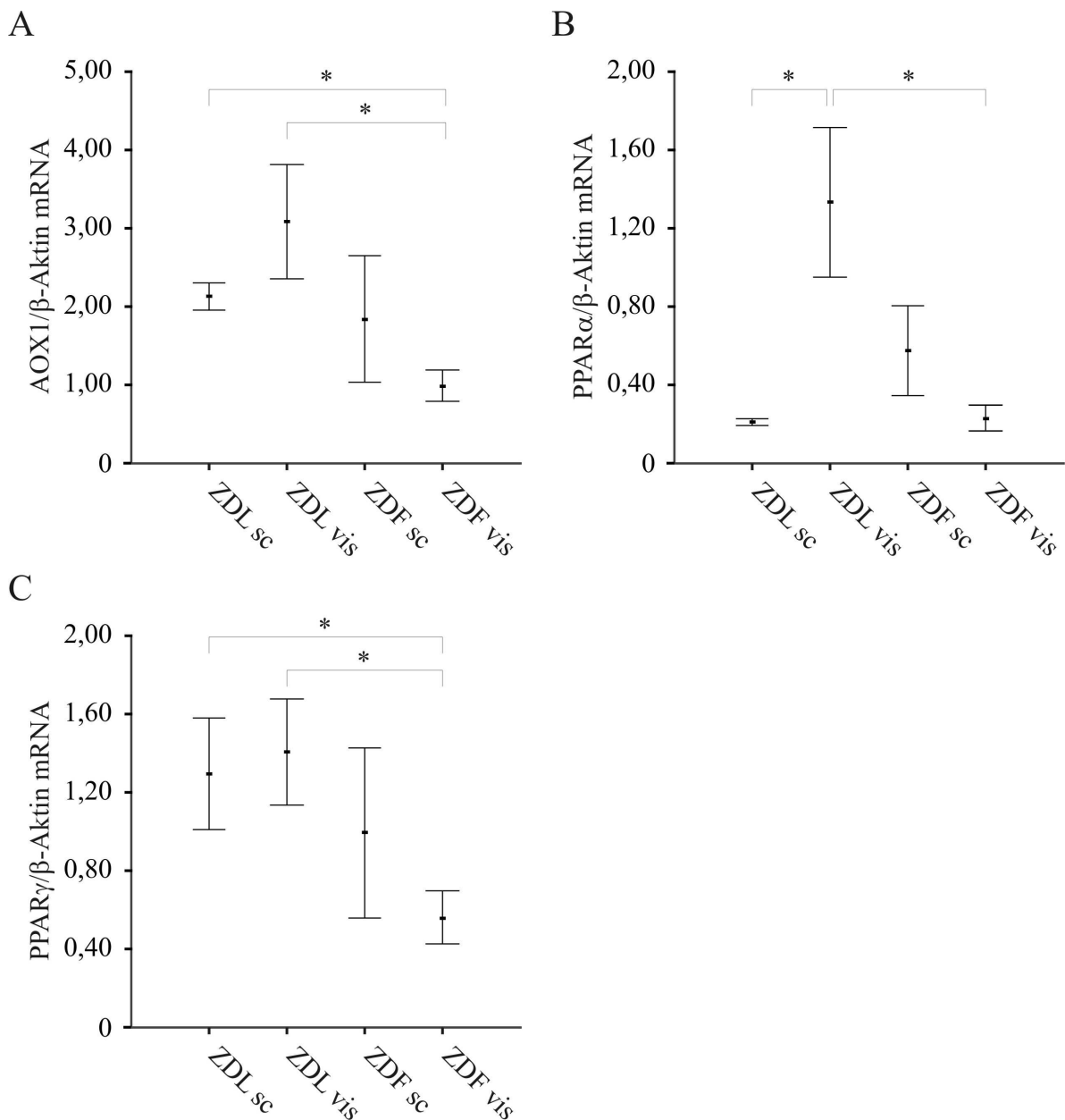


Abbildung 7: AOX1 (A), PPAR α (B) und PPAR γ (C) mRNA Expression im subkutanen (sc) und viszeralen (vis) Fett von schlanken Kontrolltieren (ZDL) und diabetischen Zuckerratten (ZDF). Die Normalisierung erfolgte mit β -Aktin. (n = 4) (* p < 0,05)

Die mRNA Expression der AOX1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe war, im Gegensatz zum humanen Fettgewebe (s. 3.1.1.1) sowohl in den insulin sensitiven ZDL Ratten als auch den insulinresistenten ZDF Ratten gleich. Jedoch war die Expression im viszeralen Fettgewebe der ZDF Ratten signifikant niedriger ($0,98 \pm 0,39$) verglichen mit der im subkutanen ($2,12 \pm 0,35$, $p = 0,008$) oder viszeralen ($3,08 \pm 1,46$, $p = 0,039$) Fettgewebe der ZDL Ratten (Abb. 7A). Eine ähnliche Abnahme der mRNA Expression im viszeralen Fettgewebe der ZDF Ratten zeigt der Transkriptionsfaktor PPAR γ , dessen Expression mit ($0,56 \pm 0,27$) im viszeralen Fettgewebe der ZDF Ratten signifikant niedriger ist als im subkutanen ($1,30 \pm 0,57$, $p = 0,033$) oder viszeralen ($1,41 \pm 0,47$, $p = 0,014$) Fettgewebe der ZDL Ratten (Abb. 7C). Die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR α war im viszeralen Fettgewebe der insulin sensitiven ZDL Ratten signifikant höher als im subkutanen Fettgewebe ($1,34 \pm 0,66$ zu $0,21 \pm 0,04$, $p = 0,009$). In den insulinresistenten ZDF Ratten war diese stark unterschiedliche Expression in den verschiedenen Fettgewebsdepots jedoch nicht zu erkennen (Abb. 7B).

Wie bei den C57BL/6 Mäusen und den Hochfettratten war ein immunchemischer Nachweis des AOX1 Proteins im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der ZDL und der ZDF Ratten nicht möglich (s. 3.1.1.2 und 3.1.1.3).

3.1.2 Expression der Aldehydoxidase 1 in Adipozyten

Nachdem eine Expression der AOX1 in Adipozyten des humanen Fettgewebes immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, wurden Funktion und Regulation der AOX1 in primären humanen Adipozyten sowie in der murinen Adipozytenzelllinie 3T3-L1 genauer charakterisiert.

3.1.2.1 Expression der Aldehydoxidase 1 in primären humanen Adipozyten

Eine Expression des AOX1 Proteins konnte in primären humanen Adipozyten des subkutanen Fettgewebes dreier Spenderinnen mittels Immunoblot detektiert werden (Abb. 8). Die Expression war deutlich, wenn auch etwas schwächer als in der humanen Leberzelllinie HepG2, welche als Positivkontrolle auf dem gleichen Blot analysiert wurde.

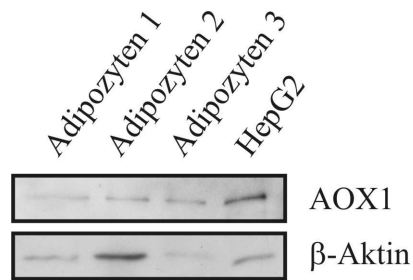


Abbildung 8: Nachweis der AOX1 Proteinexpression mittels Immunoblot in gereinigten subkutanen humanen Adipozyten dreier Spenderinnen und in der Leberzelllinie HepG2. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

In einer Immunoblotanalyse der Proteinexpression von Präadipozyten, die aus dem subkutanen Fettgewebe dreier Spenderinnen isolierten wurden, ließ sich AOX1 nicht detektieren, während das Protein in den entsprechenden aus diesen Zellen in vitro differenzierten Adipozyten stark exprimiert war.

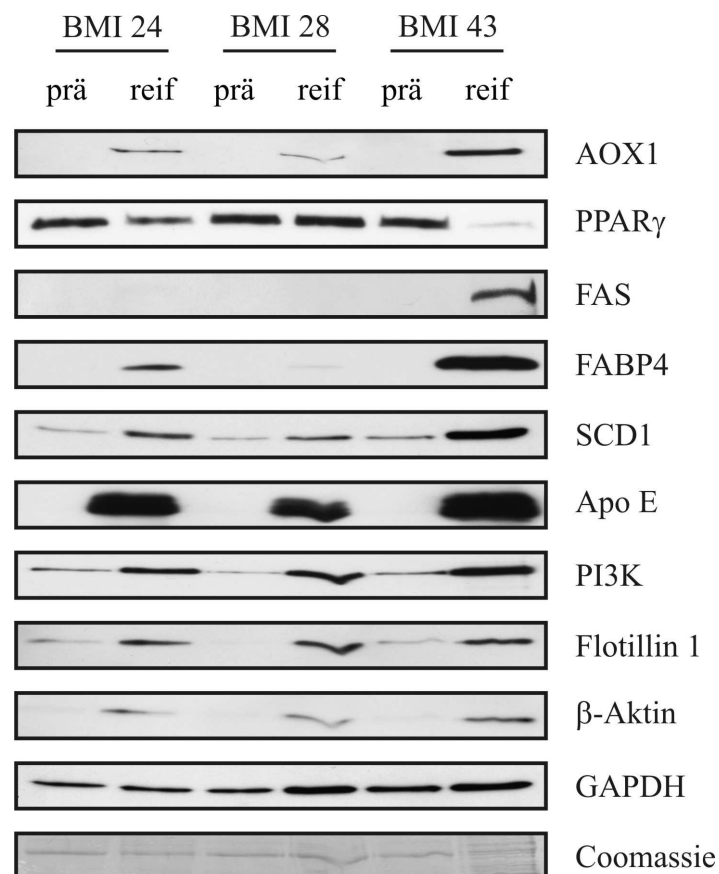


Abbildung 9: Western Blot Analyse der Proteinexpression von AOX1, $\text{PPAR}\gamma$, FAS, FABP4, SCD1, ApoE, Flotillin 1 und β -Aktin in subkutanen Präadipozyten (prä) und in vitro differenzierten reifen Adipozyten (reif) dreier Spenderinnen mit unterschiedlichem BMI. Die Expression von GAPDH sowie die Färbung der Membran mit Coomassie bestätigen eine gleichmäßige Probenbeladung.

Die Expression der AOX1 wird demnach während der Adipogenese stark induziert (Abb. 9). Da die Expression von β -Aktin eine ähnliche Regulation aufzeigte, wurde eine gleichmäßige Probenbeladung an Hand der Expression der GAPDH sowie mit einer Coomassie-Färbung der Membran nachgewiesen.

Fatty Acid Binding Protein (FABP4), Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), ApoE, PI3K und Flotillin 1 waren ebenfalls in den reifen Adipozyten wesentlich stärker exprimiert als in den Präadipozyten, während Fatty Acid Synthase (FAS) nur in den reifen Adipozyten einer Spenderin nachgewiesen werden konnte. PPAR γ hingegen war in den Adipozyten zweier Spenderinnen schwächer exprimiert als in den entsprechenden Präadipozyten.

3.1.2.2 Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten

Für weitere in vitro Analysen wurde die murine Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 verwendet, eine der am häufigsten eingesetzten und am besten charakterisierten präadipozytären Zelllinien für die Untersuchung der Differenzierung und der Funktion von Adipozyten [192]. Durch Zugabe eines definierten Differenzierungsmediums lassen sich die 3T3-L1 Fibroblasten (Präadipozyten) im Verlauf von neun Tagen zu reifen Adipozyten differenzieren (s. 2.2.1.4). Die Verwendung einer Adipozytenzelllinie bietet zum einen den Vorteil einer unbegrenzten Verfügbarkeit von Zellen und zum anderen die Möglichkeit unter standardisierten Bedingungen den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Adipogenese bzw. auf die Adipozytenfunktion zu untersuchen.

3.1.2.2.1 Expression der Aldehydoxidase 1 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten

Die Expression der AOX1 war in reifen primären humanen Adipozyten gegenüber Präadipozyten stark induziert (Abb. 9). In 3T3-L1 Zellen konnte ebenfalls eine starke Zunahme der AOX1 Expression während der Adipogenese detektiert werden. Hierfür wurden 3T3-L1 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung abgenommen und die mRNA- und Proteinexpression in diesen Proben analysiert. Die mRNA Expression der AOX1 nahm am Tag 2 (2d) nach Induktion der Adipozytendifferenzierung stark zu und war dann nahezu viermal höher als in den Präadipozyten (prä), um sich zwischen Tag 2 (2d) und Tag 6 (6d) nochmals fast zu verdoppeln (Abb. 10A). Auf Proteinebene war AOX1 in den Präadipozyten zunächst schwach exprimiert, nahm dann jedoch 24 h (1d) nach Induktion der Differenzierung stark zu (Abb. 11).

Die Expression von PPAR γ nahm in den 3T3-L1 Zellen während der Adipozytendifferenzierung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ab Tag 3 (3d) der Differenzierung stark zu (Abb. 10B und Abb. 11). Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein [220, 221].

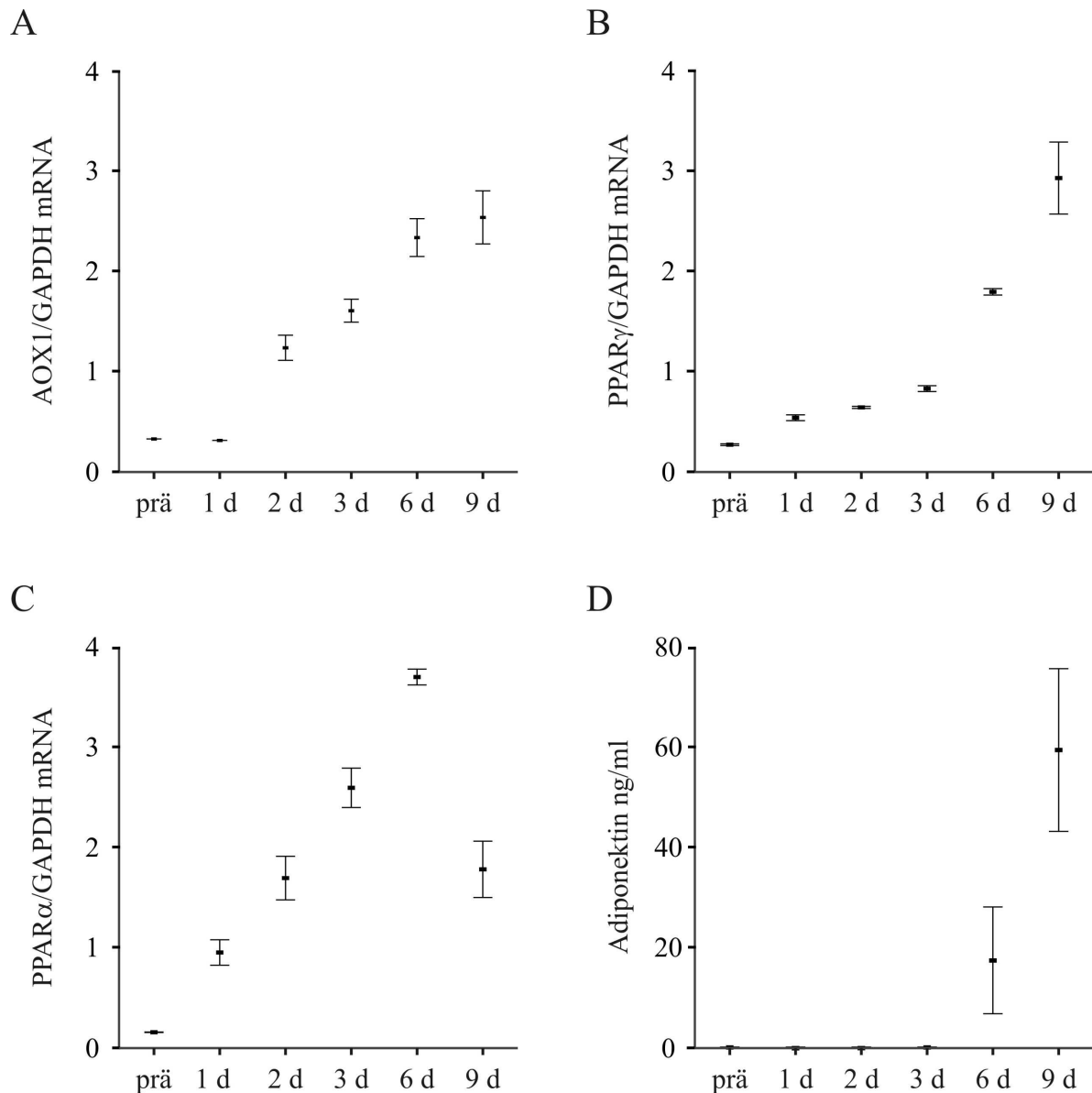


Abbildung 10: Bestimmung der mRNA Expression von AOX1 (A), PPAR α (B) und PPAR γ (C) in 3T3-L1 Präadipozyten (prä), in 3T3-L1 Zellen 1 (1d), 2 (2d), 3 (3d) bzw. 6 (6d) Tage nach Induktion der Adipozytendifferenzierung und in reifen 3T3-L1 Adipozyten (9d). Die Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Bestimmung von Adiponektin im Überstand von 3T3-L1 Zellen während der Adipozytendifferenzierung (D).

Die Expression von PPAR α auf mRNA Ebene stieg während der Differenzierung kontinuierlich an und war am Tag 6 fast sechszwanzigmal so hoch wie in den Präadipozyten, um dann in den reifen Adipozyten wieder um die Hälfte abzunehmen (Abb. 10C). Auf Proteinebene war PPAR α an den Tagen 1 und 2 nach Induktion der Adipozytendifferenzierung stark induziert (Abb. 11). Das insulinsensitivierende Adipozytokin Adiponektin wird durch PPAR γ induziert und konnte als spezifisches Protein reifer Adipozyten ab Tag 6 der Differenzierung im Überstand der 3T3-L1 nachgewiesen werden. Am stärksten wurde es von reifen Adipozyten am Tag 9 (9d) sezerniert (Abb. 10D) [222].

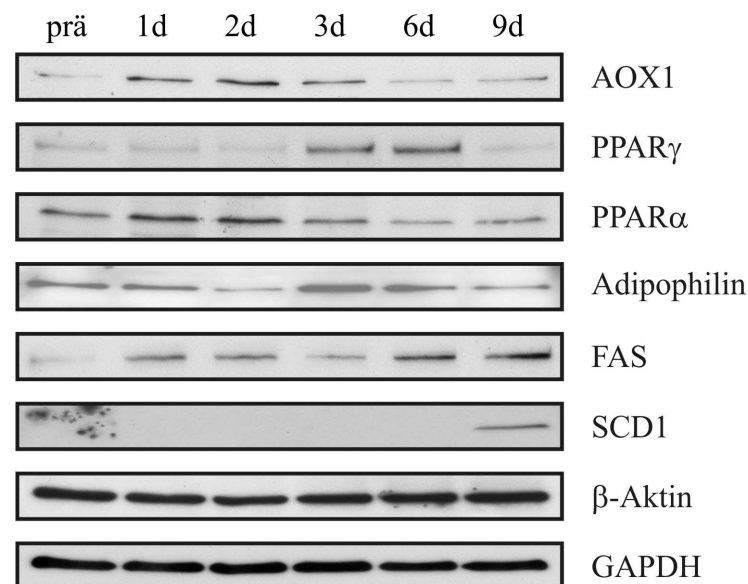


Abbildung 11: Analyse der Proteinexpression von AOX1, PPAR γ , PPAR α , Adipophilin, FAS und SCD1 mittels Immunoblot in 3T3-L1 Zellen während der Adipozytendifferenzierung. Die Detektion von β -Aktin und GAPDH in den Proben zeigte eine gleichmäßige Beladung.

Des Weiteren wurde die Proteinexpression von Adipophilin, SCD1 und FAS mittels Immunoblot in den 3T3-L1 Zellen während der Differenzierung überprüft [223]. Während sich keine Regulation der Proteinexpression von Adipophilin während der Adipogenese zeigte, nahm die Expression des durch PPAR α regulierten Proteins FAS kontinuierlich zu und war am stärksten in reifen Adipozyten exprimiert [224]. SCD1 Protein hingegen konnte ausschließlich in reifen Adipozyten detektiert werden (Abb. 11) [225].

3.1.2.2.2 Regulation der Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten

Adipositas ist mit einer leichten chronischen Entzündung assoziiert, welche durch die erhöhten systemischen Spiegel von Fettsäuren, inflammatorischen Zytokinen und Endotoxin bedingt ist. Des Weiteren ist in der Adipositas die Adipogenese im Fettgewebe gestört: es werden weniger Lipide im Fettgewebe eingelagert und andere Adipozytokine sezerniert. All diese Faktoren begünstigen die Entstehung einer Insulinresistenz [45, 51, 226].

Vor diesem Hintergrund wurde daher der Einfluss von Aspirin, Lipopolysaccharid (LPS), Glukose, Insulin und Fettsäuren sowie von Metformin, Pioglitazon und Fenofibrat, welche zur medikamentösen Behandlung der Insulinresistenz eingesetzt werden, auf die Expression der AOX1 in 3T3-L1 Adipozyten untersucht.

3.1.2.2.2.1 Einfluss von Acetylsalicylsäure und LPS auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten

Aspirin (Acetylsalicylsäure) wirkt antiinflammatorisch und verbessert die Wirkung von Insulin, indem es u.a. den proinflammatorischen Effekten von Fettsäuren und Zytokinen entgegenwirkt [227, 228]. LPS hingegen wirkt stark proinflammatorisch. Für das Metabolische Syndrom wurden stark erhöhte systemische Endotoxinwerte im Plasma nachgewiesen [226].

Stimulation von reifen 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit Konzentrationen von 1 bis 100 μ M Acetylsalicylsäure hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression der Aldehydoxidase 1 (nicht gezeigt). Ebenso zeigte eine Inkubation von reifen 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit 10 ng/ml LPS bzw. die Differenzierung der 3T3-L1 Zellen in Anwesenheit von 10 ng/ml LPS keine Auswirkung auf die Menge des AOX1 Proteins in diesen Zellen (nicht gezeigt).

3.1.2.2.2.2 Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten

Eine Insulinresistenz in Folge von starkem Übergewicht geht mit erhöhten Blutglukosespiegeln einher. Um diese Situation zu simulieren, wurden reife 3T3-L1 Adipozyten nach Abschluss der Differenzierung für drei Tage unter normoglykämischen (NG, 5 mM Glukose im Zellkulturmedium) bzw. hyperglykämischen (HG, 25 mM

Glukose) Bedingungen (s. 2.2.1.4.3) kultiviert und anschließend für 24 h mit 0,2 bzw. 2 μM Insulin stimuliert.

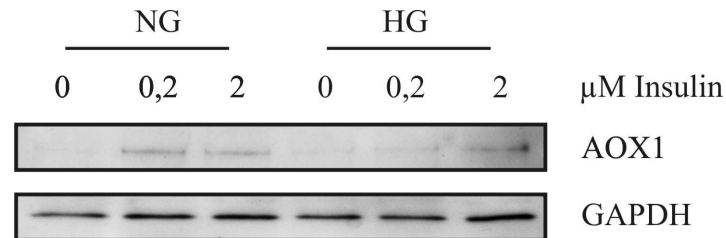


Abbildung 12: Western Blot Analyse der AOX1 Expression in reifen 3T3-L1 Adipozyten nach dreitägiger Kultivierung unter normo- bzw. hyperglykämischen Bedingungen (NG bzw. HG) und Stimulation mit 0,2 und 2 μM Insulin für 24 h. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, wird die basale Expression von AOX1 durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst. Jedoch wird die Expression der AOX1, die unter physiologischen Mengen von Glukose bereits bei Stimulation mit 0,2 μM Insulin zunimmt, unter den hyperglykämischen Versuchsbedingungen nur durch die höhere Konzentration Insulin induziert. Somit wird die Aldehydoxidase 1 bei erhöhten Mengen an Glukose und einer verminderten Wirkung von Insulin, Bedingungen wie sie im Typ 2 Diabetes vorliegen, weniger stark exprimiert.

3.1.2.2.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten

Eine erhöhte Körperfettmasse geht mit einer erhöhten Menge an zirkulierenden freien Fettsäuren einher, die die Insulinsignaltransduktion beeinträchtigen und so zu einer Insulinresistenz beitragen [229]. Um einen möglichen Einfluss von freien Fettsäuren auf die Expression der AOX1 in 3T3-L1 Adipozyten zu untersuchen, wurden 3T3-L1 Zellen in Anwesenheit von 200 bzw. 400 μM Palmitinsäure, Ölsäure oder Linolsäure differenziert (s. 2.2.1.4.3).

Eine Analyse der AOX1 Proteinexpression in den reifen Adipozyten am Tag 9 mittels Immunoblot zeigte eine leichte Reduktion mit 400 μM Palmitinsäure (PA), einer gesättigten Fettsäure, während mit 200 μM Palmitinsäure, sowie mit der einfach ungesättigten Ölsäure (OA) und der mehrfach ungesättigten Omega-6-Fettsäure Linolsäure (LA) kein Einfluss auf die Aldehydoxidase 1 zu erkennen war (Abb. 13).

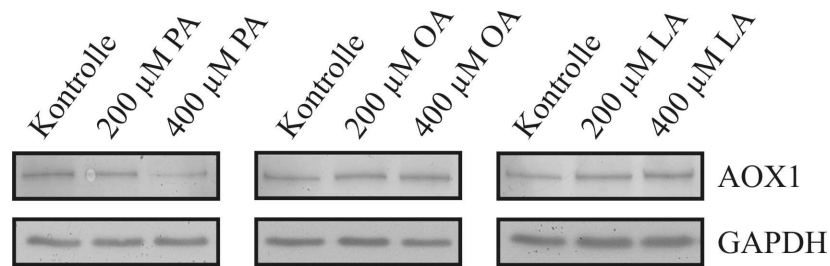


Abbildung 13: Analyse der Proteinexpression von AOX1 mittels Immunoblot in 3T3-L1 Zellen, welche während der Adipozytendifferenzierung mit Palmitinsäure (PA), Ölsäure (OA) bzw. Linolsäure (LA) (200 und 400 µM) behandelt wurden. Die Detektion von GAPDH in den Proben zeigte eine gleichmäßige Beladung des Blots.

3.1.2.2.4 Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Adipozyten

Da die Expression von AOX1 während der Adipogenese stark induziert ist und eine gestörte Adipogenese an der Pathogenese einer Adipositas assoziierten Insulinresistenz beteiligt ist, stellte sich die Frage, ob die Expression von AOX1 durch Medikamente beeinflusst wird, die zur Behandlung der Insulinresistenz eingesetzt werden.

Eine Stimulation von reifen 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit 100 und 200 µM Metformin bzw. Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Anwesenheit von 100 und 200 µM Metformin zeigten keine Regulation der AOX1 auf Proteinebene (nicht gezeigt).

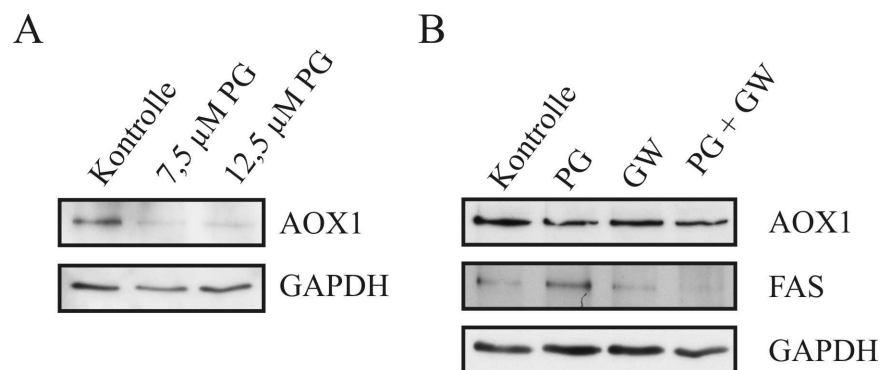


Abbildung 14: Nachweis der Proteinexpression von AOX1 und FAS in reifen 3T3-L1 Adipozyten mittels Immunoblot. GAPDH diente als Ladungskontrolle. (A) 3T3-L1 Adipozyten stimuliert für 24 h mit 7,5 bzw. 12,5 µM Pioglitazon (PG). (B) 3T3-L1 Adipozyten stimuliert für 24 h mit 3,75 µM Pioglitazon (PG) mit oder ohne einstündiger Vorinkubation mit 4 nM GW9662 (GW).

Eine Inkubation von reifen 3T3-L1 Zellen für 24 h mit 7,5 und 12,5 µM des PPAR γ Agonisten Pioglitazon hingegen führte zu einer starken Reduktion des AOX1 Proteins in diesen Zellen (Abb. 14A). Da eine einstündige Vorinkubation mit 4 nM GW9662, einem

synthetischen PPAR γ Antagonisten, die Repression der AOX1 Expression durch 3,75 μ M Pioglitazon jedoch nicht verhindern konnte, handelt es sich wohl um einen von der PPAR γ Aktivität unabhängigen Effekt des Pioglitazons (Abb. 14B).

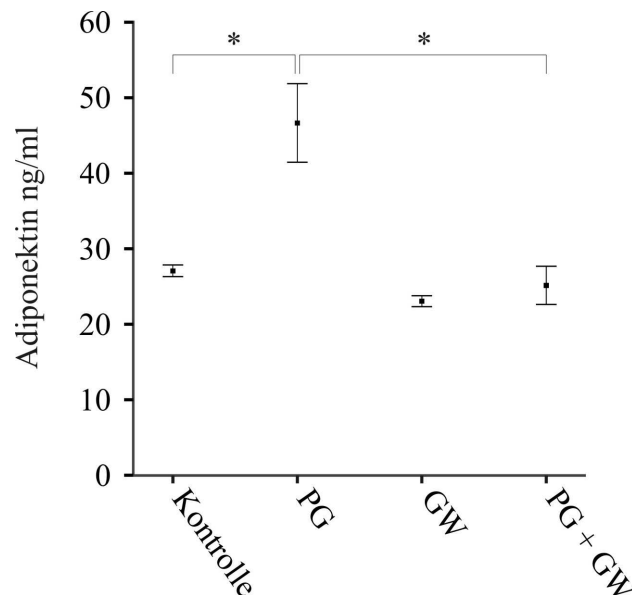


Abbildung 15: Bestimmung von Adiponektin in den Zellkulturüberständen von 3T3-L1 Adipozyten, welche für 24 h mit 3,75 μ M Pioglitazon (PG) mit oder ohne einstündiger Vorinkubation mit 4 nM GW9662 (GW) stimuliert wurden.

Als Positivkontrolle wurde FAS im Zelllysat sowie Adiponektin im Zellkulturüberstand bestimmt. Die bereits bekannte Induktion der FAS Expression durch Pioglitazon wurde durch den Antagonisten gehemmt [230]. Ebenso erhöhte die Stimulation mit Pioglitazon wie erwartet signifikant die Menge an Adiponektin im Zellkulturüberstand, während GW9662 in der Lage war, diesen PPAR γ spezifischen Effekt zu unterdrücken (Abb. 15) [49, 231]. Die Verwendung von 8 nM GW9662 führte zu vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt).

Eine Stimulation von reifen 3T3-L1 Adipozyten mit dem PPAR α Agonisten Fenofibrat (10 und 50 μ M) für 24 h führte bei einer Konzentration von 50 μ M Fenofibrat (FF) ebenfalls zu einer Reduktion des AOX1 Proteins in den Zellen (Abb. 16A). Eine einstündige Vorinkubation mit 5 μ M RU486 (RU), einem PPAR α Antagonisten, vermochte den reprimierenden Effekt von Fenofibrat zum Teil zu hemmen (Abb. 16B). Dies spricht dafür, dass PPAR α zumindest an der von Fenofibrat vermittelten Reduktion der AOX1 beteiligt ist.

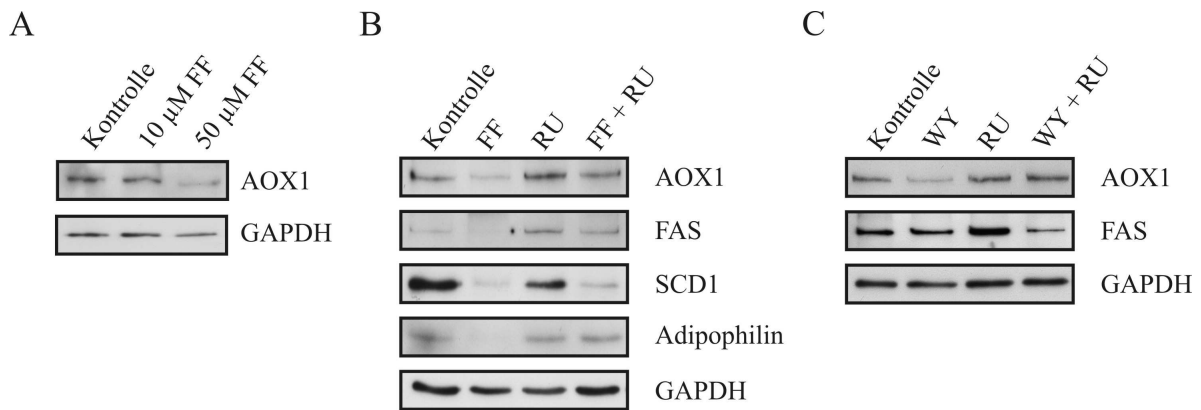


Abbildung 16: Analyse der Proteinexpression von AOX1, FAS, SCD1 und Adipophilin mittels Immunoblot in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die 24 h mit 10 und 50 μ M Fenofibrat (FF) behandelt wurden (A), bzw. 24 h mit 50 μ M Fenofibrat (FF) (B) oder 20 μ M WY 14643 (WY) (C) ohne oder mit einstündiger Vorbehandlung mit 5 μ M RU 486 (RU). GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Bei Einsatz des spezifischen PPAR α Agonisten WY 14643 (WY) wurde die Reduktion der AOX1 durch Vorstimulation mit RU486 vollständig verhindert (Abb. 16C). FAS, ein PPAR α reguliertes Protein, sowie SCD1 und Adipophilin, zwei an der Lipideinlagerung beteiligte Proteine, zeigten eine ähnliche Regulation wie AOX1 bei Stimulation mit Fenofibrat bzw. WY 14643 und RU486 (Abb. 16B und 16C, und nicht gezeigt) [224, 232, 233].

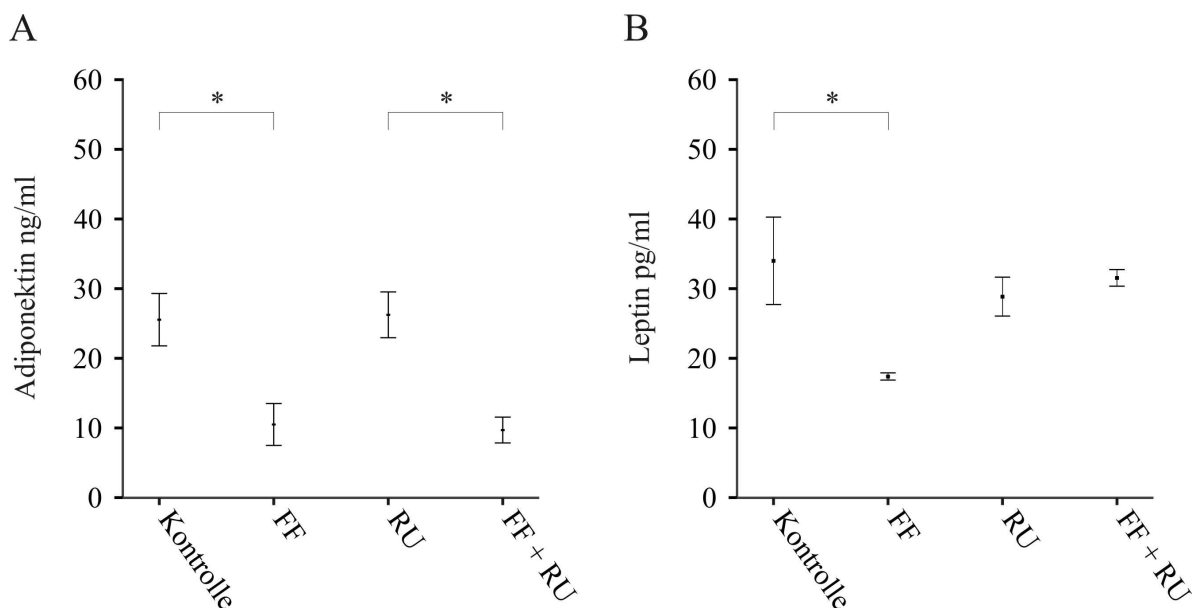


Abbildung 17: Bestimmung von Adiponektin (A) und Leptin (B) in den Zellkulturüberständen von 3T3-L1 Adipozyten, die für 24 h mit 50 μ M Fenofibrat in Kombination mit 5 μ M RU 486 (RU) stimuliert wurden.

Zusätzlich wurden in den Zellkulturüberständen der mit 50 μ M Fenofibrat und 5 μ M RU486 stimulierten Zellen Adiponektin und Leptin bestimmt, von welchen eine Reduktion durch Fenofibrat bzw. Bezafibrat beschrieben wurde [74, 234, 235]. In den Überständen der unstimulierten Kontrollzellen betrug Adiponektin $25,7 \pm 3,8$ ng/ml bzw. $26,4 \pm 3,3$ ng/ml in den Überständen der allein mit RU486 stimulierten 3T3-L1 Zellen. Stimulation mit Fenofibrat führte zu einer signifikanten Reduktion des Adiponektins im Überstand auf $10,6 \pm 3,0$ ng/ml ($p = 0,003$ im Vergleich zur Kontrolle). Eine ähnliche Reduktion zeigte sich mit $9,8 \pm 1,9$ ng/ml bei Stimulation mit Fenofibrat und RU486 gegenüber den mit RU486 stimulierten Zellen ($p = 0,01$) (Abb. 17).

3.1.2.2.3 Effekte des Knock-downs der Aldehydoxidase 1 in 3T3-L1 Zellen

Da die Expression der Aldehydoxidase 1 während der Adipogenese stark induziert wurde (s. 3.1.2.1 und 3.1.2.2.1), stellte sich die Frage, welche Auswirkungen eine verminderte Expression dieses Proteins während der Adipozytendifferenzierung haben würde.

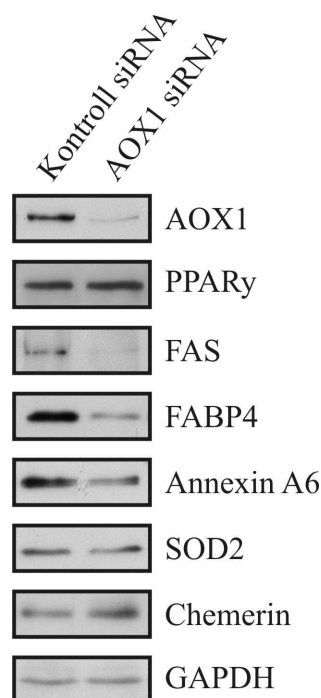


Abbildung 18: Analyse der Proteinexpression von AOX1, PPAR γ , FAS, FABP4, Annexin A6, SOD2 und Chemerin in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM AOX1 siRNA bzw. 100 nM Kontroll siRNA transfiziert wurden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Daher wurde die Expression der AOX1 mittels Knock-downs vor Einleitung der Differenzierung reprimiert. Hierfür wurden 3T3-L1 Zellen am Tag 0 vor Zugabe des Differenzierungsmediums mit 100 nM AOX1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert (s. 2.1.13 und 2.2.1.4.4) und dann gemäß dem Standardprotokoll zu Adipozyten differenziert. Nach Abschluss der Differenzierung am Tag 9 war in den mit AOX1 siRNA behandelten Zellen deutlich weniger AOX1 Protein vorhanden (Abb. 18). Ebenso war die Expression von FAS, FABP4 und Annexin A6 deutlich reduziert, während sich kein Unterschied in der Proteinexpression von PPAR γ , Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) und Chemerin erkennen ließ.

Bei Färbung der Zellen mit Oil Red O (s. 2.2.4.9) zeigte sich, dass die Einlagerung von Lipiden in den AOX1 siRNA behandelten Zellen deutlich reduziert war (Abb. 19).

Die Bestimmung der Triglyzeride in den Zelllysaten von 3T3-L1 Adipozyten am Tag 9 der Differenzierung, die am Tag 0 (d0), am Tag 3 (d3) bzw. am Tag 6 (d6) der Differenzierung mit AOX1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert wurden, zeigte, dass ein Knock-down der AOX1 am Tag 0 oder Tag 3 der Differenzierung zu etwa 30% niedrigeren Triglyzeriden führte, während ein Knock-down am Tag 6 der Differenzierung keine Auswirkung auf die zelluläre Triglyzeridmenge hatte (Abb. 20A).

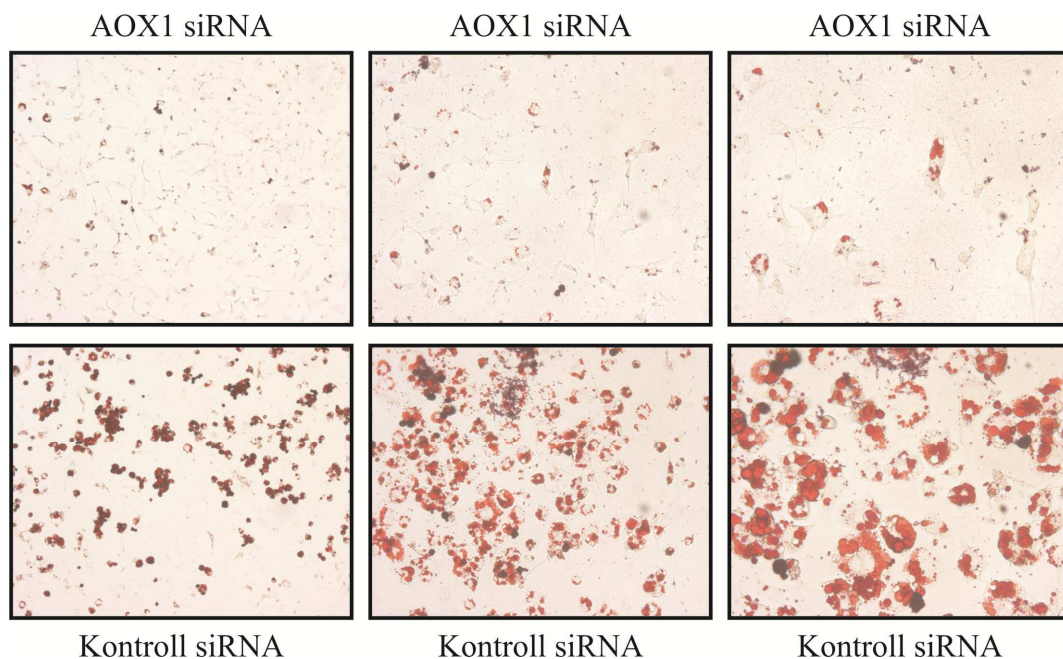


Abbildung 19: Oil Red O Färbung der Lipidtropfen in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die mit AOX1 siRNA (oben) oder Kontroll siRNA (unten) transfiziert wurden. Lipide in der Zelle sind durch die Färbung rot dargestellt (100fache Vergrößerung). Ein vergrößerter Ausschnitt der beiden mittleren Bilder ist rechts zu sehen (400fache Vergrößerung).

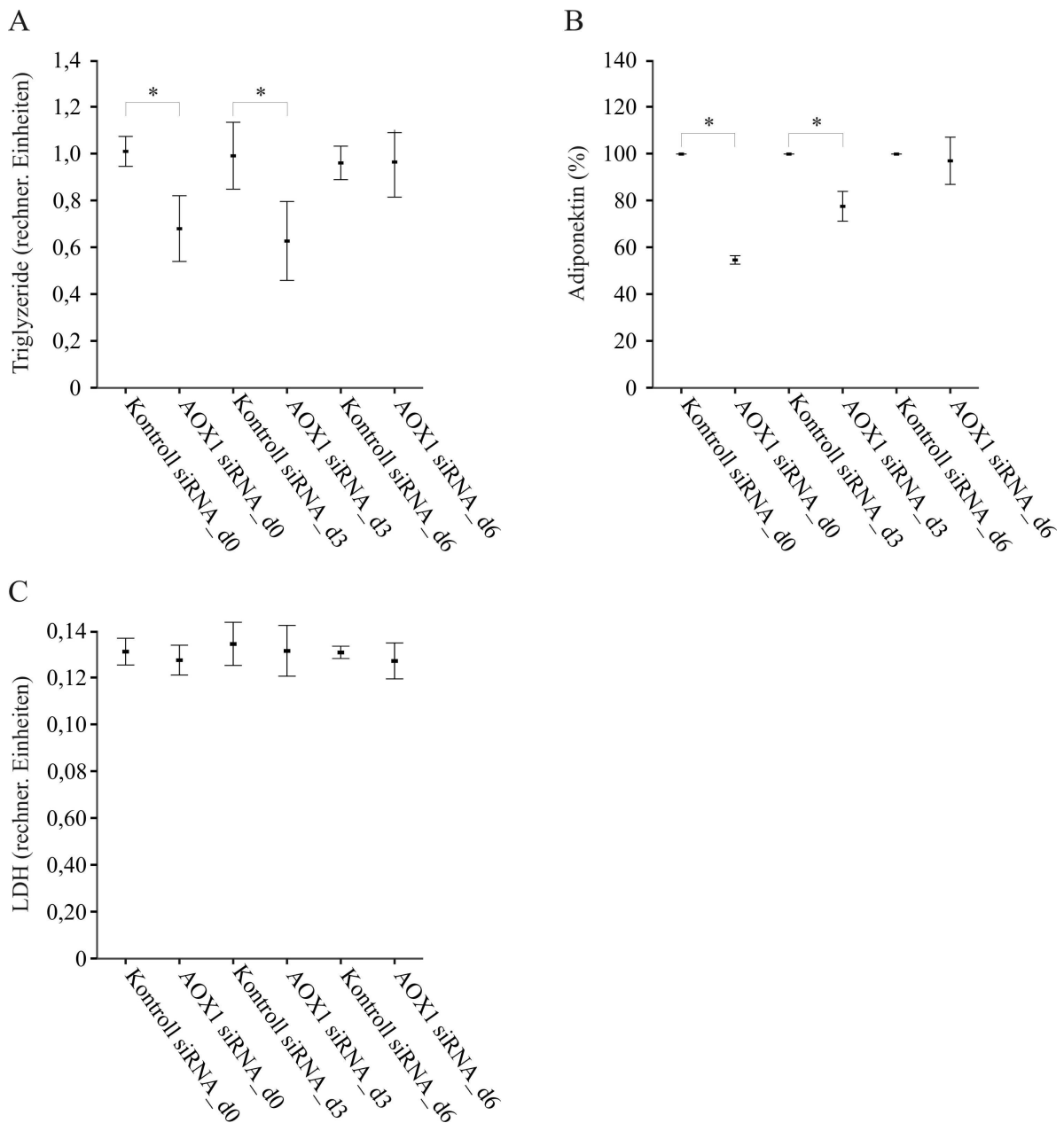


Abbildung 20: Bestimmung der Triglyzeride (A) in den Zelllysaten bzw. von Adiponektin (B) und LDH (C) in den Zellkulturüberständen am Tag 9 der Differenzierung von reifen 3T3-L1 Adipozyten, die am Tag 0 (d0), am Tag 3 (d3) bzw. am Tag 6 (d6) der Differenzierung mit AOX1 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert wurden.

In den Zellkulturüberständen derselben Zellen wurden auch Adiponektin und LDH gemessen. Adiponektin war in den Überständen der am Tag 0 bzw. Tag 3 der Differenzierung mit AOX1 siRNA transfizierten Zellen mit $51,4 \pm 6,1\%$ ($p = 0,003$) bzw. $78,5 \pm 4,7\%$ ($p = 0,008$) relativ zu den am gleichen Tag mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen (100%) signifikant reduziert. Zellen, die am Tag 6 der Adipozytendifferenzierung mit AOX1 siRNA behandelt wurden, sezernierten ähnliche Mengen an Adiponektin wie die entsprechenden Kontroll siRNA transfizierten Zellen ($97,7 \pm 10,0\%$ zu 100%) (Abb. 20B).

Die Menge der Lactatdehydrogenase (LDH) in den Überständen dieser Zellen war nicht erhöht. Dies schloss eine sekundär verminderte Adiponektinsekretion in Folge erhöhten Zelltods in den AOX1 siRNA behandelten Zellen aus (Abb. 20C).

3.2 Superoxid-Dismutase 2

Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) ist ein mitochondriales homotetrameres Enzym von 80 kDa, das die Disproportionierung von Superoxid-Anionen katalysiert und so dem Schutz vor Sauerstoffradikalen dient [106]. Die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und unterliegt einer strikten Kontrolle. Ein Übermaß an ROS vermindert so z.B. die insulinstimulierte Glukoseaufnahme und fördert die Differenzierung von Muskelstammzellen und Knochenmarkstromazellen zu Adipozyten [110-112]. Als antioxidatives Enzym könnte die SOD2 daher eine wichtige Rolle bei der Adipogenese und der Insulinsensitivität spielen und von Bedeutung für das Metabolische Syndrom sein.

Daher sollte in dieser Arbeit zunächst die Expression der SOD2 im humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebe sowie im Fettgewebe adipöser und diabetischer Tiere analysiert und anschließend die Funktion und Regulation der SOD2 in Adipozyten untersucht werden.

3.2.1 Expression der Superoxid-Dismutase 2 im Fettgewebe

3.2.1.1 Expression der Superoxid-Dismutase 2 im humanen Fettgewebe

Eine Analyse der Expression der Superoxid-Dismutase 2 in gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von zehn Spendern zeigte eine deutlich stärkere Expression im Unterhautfettgewebe. In Abbildung 21 ist beispielhaft das Ergebnis der Immunoblotanalyse von drei Spendern wiedergegeben. Ein Zusammenhang mit Geschlecht, Alter, Adipositas oder Diabeteserkrankung der Spender war nicht zu erkennen.

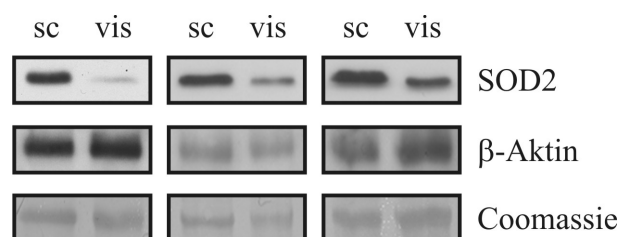


Abbildung 21: Analyse der Proteinexpression der SOD2 in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes dreier Spender mittels Immunoblot. Die Expression von β-Aktin sowie die Färbung der Membran mit Coomassie bestätigen eine gleichmäßige Probenbeladung.

Die höhere Expression der SOD2 im subkutanen Fettgewebe könnte mit der beschriebenen höheren Aufnahme und Speicherung von Fettsäuren sowie der höheren Lipolyse im subkutanen Fettgewebe zusammenhängen (s. 3.1.1.1) [5].

3.2.1.2 Expression der Superoxid-Dismutase 2 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus

Eine Untersuchung der Proteinexpression der SOD2 in gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von männlichen C57BL/6 Mäusen zeigte ein ähnliches Ergebnis.

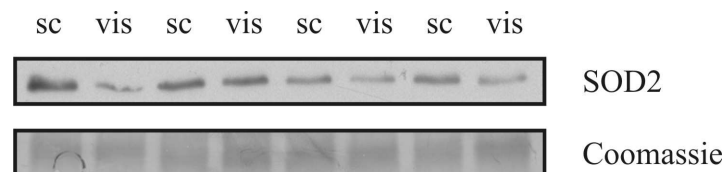


Abbildung 22: Western Blot Analyse der SOD2 Proteinexpression in den gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von vier C57BL/6 Mäusen. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran bestätigt die gleichmäßige Probenbeladung.

Im subkutanen Fettgewebe von vier Tieren war die Expression eindeutig stärker als im viszeralen Fettgewebe (Abb. 22). Allerdings war der Unterschied in den Fettdepots im Vergleich zum humanen Fettgewebe weniger stark ausgeprägt.

3.2.1.3 Expression der Superoxid-Dismutase 2 im viszeralen Fettgewebe der Hochfettratte

Zudem wurde die Expression der SOD2 im viszeralen Fettgewebe von Wistar Ratten untersucht, welche durch Fütterung einer Hochfettdiät eine Adipositas entwickelten. Im Vergleich zu den schlanken, mit einer Standarddiät gefütterten Kontrolltieren (ST) war in den adipösen, mit einer Hochfettdiät gefütterten Tieren die Expression der SOD2 im viszeralen Fettgewebe deutlich erhöht.

Diese Induktion war, unabhängig von der verwendeten Fettart, sowohl in den mit Schweineschmalz (HF) (Abb. 23) als auch in den mit Kokosnussfett (KF) oder Olivenöl (OF) (nicht gezeigt) gefütterten Tieren zu sehen.

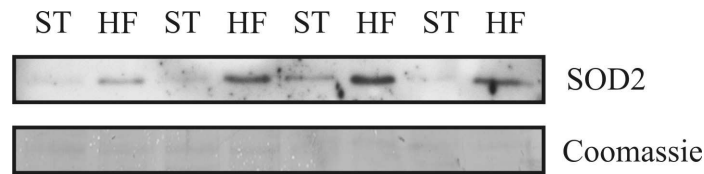


Abbildung 23: Nachweis der Proteinexpression der SOD2 im viszeralen Fettgewebe von schlanken mit Standarddiät gefütterten (ST) und adipösen mit auf Schweineschmalz basierenden Hochfettdiät gefütterten (HF) Wistar Ratten mittels Immunoblot. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Coomassie-Färbung der Membran sichergestellt.

3.2.1.4 Expression der Superoxid-Dismutase 2 im Fettgewebe der Zuckerratte

In gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes insulinresistiver Zuckerratten (ZDL) und diabetischer Zuckerratten (ZDF) war immunchemisch eine stärkere Expression der SOD2 im viszeralen Fettgewebe der Tiere zu erkennen (Abb. 24A).

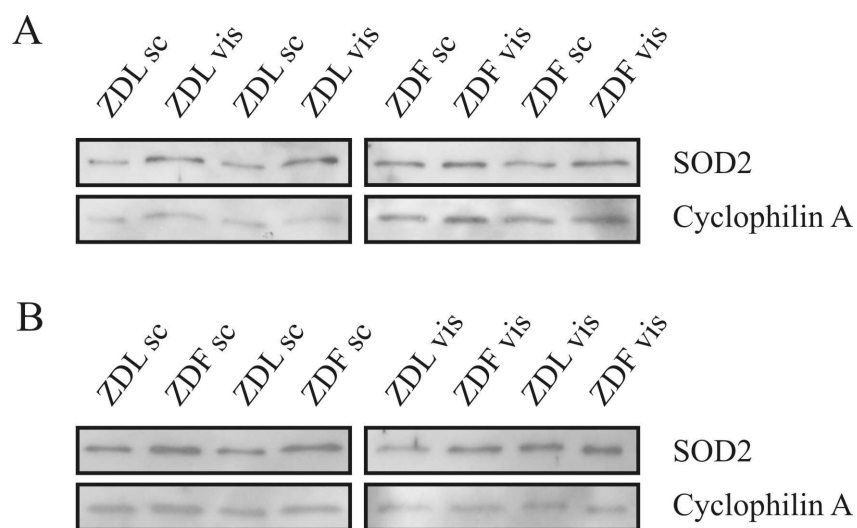


Abbildung 24: Immunoblotanalyse des SOD2 Proteins in gepaarten Proben subkutanen (sc) und viszeralen (vis) Fettgewebes (A) bzw. im subkutanen Fettgewebe und viszeralen Fettgewebe (B) nicht diabetischer Kontrolltiere (ZDL) und diabetischer Zuckerratten (ZDF). Als Ladungskontrolle diente Cyclophilin A.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur höheren Expression des SOD2 Proteins im subkutanen Fettgewebe der C57BL/6 Mäuse und der humanen Probanden. Eine Erklärung hierfür könnte der unterschiedliche Ursprungsort der viszeralen Fettgewebsprobe sein. Während es sich bei den murinen und humanen viszeralen Fettgewebsproben um omentales Fettgewebe handelt, wurde das viszerale Fettgewebe der Zuckerratten retroperitoneal gewonnen.

Ein Vergleich der Expression der SOD2 in den subkutanen bzw. den viszeralen Fettgewebsproben der nicht diabetischen und der diabetischen Zuckerratten zeigte eine stärkere Expression der SOD2 im subkutanen Fettgewebe der diabetischen Tiere. Im viszeralen Fettdepot hingegen war kein Unterschied in der SOD2 Proteinexpression zwischen den nicht diabetischen und den diabetischen Ratten ersichtlich (Abb. 24B).

3.2.2 Expression der Superoxid-Dismutase 2 in Adipozyten

3.2.2.1 Expression der Superoxid-Dismutase 2 in primären humanen Adipozyten

Eine Immunoblotanalyse der SOD2 Proteinexpression in Präadipozyten (prä) und in vitro differenzierten reifen Adipozyten (reif) aus dem subkutanen Fettgewebe dreier Spenderinnen offenbarte eine starke Induktion des Proteins während der Adipogenese (s. 3.1.2.1).

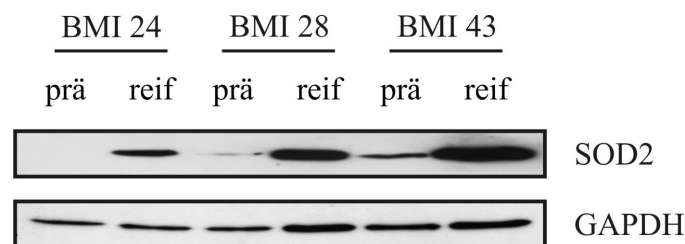


Abbildung 25: Western Blot Analyse der Proteinexpression von SOD2 in subkutanen Präadipozyten (prä) und in vitro differenzierten reifen Adipozyten (reif) dreier Spenderinnen mit unterschiedlichem BMI. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

In Präadipozyten ließ sich die SOD2 nicht oder nur schwach detektieren. In reifen Adipozyten hingegen war die SOD2 sehr stark exprimiert (Abb. 25).

Die Stimulation reifer humaner Adipozyten aus dem subkutanen Fettgewebe weiblicher Spender mit Adiponektin in einer Konzentration von 10 µg/ml zeigte keinen Einfluss auf die Expression von SOD2 (nicht gezeigt).

3.2.2.2 Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten

3.2.2.2.1 Expression der Superoxid-Dismutase 2 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten

Die starke Induktion der SOD2 während der Adipogenese humaner Adipozyten konnte auch während der in vitro Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten nachgewiesen werden. In 3T3-L1 Präadipozyten ist die SOD2 wie in den humanen Präadipozyten nur schwach exprimiert, um dann bereits 24 h nach Induktion der Adipozytendifferenzierung (d1) stark zuzunehmen. Im Verlauf der Differenzierung nahm die Expression der SOD2 bis zum letzten Tag (Tag 9) der Differenzierung stetig zu und erreichte in den reifen 3T3-L1 Adipozyten ihr höchstes Expressionsniveau (Abb. 26).

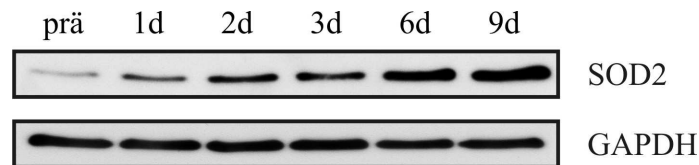


Abbildung 26: Bestimmung der Proteinexpression der SOD2 mittels Western Blot in 3T3-L1 Präadipozyten (prä), in 3T3-L1 Zellen 1 (1d), 2 (2d), 3 (3d) bzw. 6 (6d) Tage nach Induktion der Adipozytendifferenzierung und in reifen 3T3-L1 Adipozyten (9d). Die Kontrolle der Beladung erfolgte durch Nachweis von GAPDH in denselben Proben.

3.2.2.2.2 Regulation der Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten

3.2.2.2.2.1 Einfluss von Acetylsalicylsäure und LPS auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten

Die Stimulation von reifen 3T3-L1 Adipozyten mit antiinflammatorisch wirkender Acetylsalicylsäure in Konzentrationen bis zu 100 μ M für 24 h führte nicht zu einer Veränderung der SOD2 Proteinexpression (nicht gezeigt). Auch eine vierundzwanzigstündige Inkubation von 3T3-L1 Adipozyten mit proinflammatorisch wirkendem LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml hatte keinen Einfluss auf die Expression der SOD2 (nicht gezeigt).

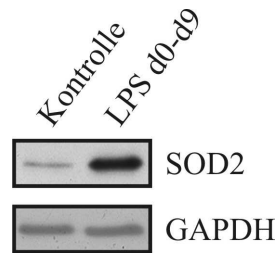


Abbildung 27: Detektion der SOD2 mittels Immunoblot in 3T3-L1 Adipozyten, die während der neuntägigen Differenzierung mit 10 ng/ml LPS stimuliert wurden. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Hingegen zeigten 3T3-L1 Adipozyten, die in Gegenwart von 10 ng/ml LPS differenziert wurden, wie erwartet eine sehr starke Zunahme an SOD2 Protein (Abb. 27) [106]. Dies könnte mit den durch LPS induzierten ROS zu erklären sein [236].

3.2.2.2.2 Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten

Hohe Konzentrationen von Glukose führen nachweislich zu erhöhten ROS Mengen und Insulinresistenz [111, 237]. Eine Kultivierung von reifen 3T3-L1 Zellen für drei Tage unter hyperglykämischen (25 mM) Bedingungen war jedoch nicht mit einer vermehrten Expression von SOD2 Protein im Vergleich zu normoglykämisch (5 mM) kultivierten Zellen verbunden (nicht gezeigt). Auch eine Stimulation mit Insulin führte nicht zu einer Veränderung der SOD2 Expression (nicht gezeigt).

3.2.2.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten

Hohe Konzentrationen an zirkulierenden Fettsäuren und eine damit einhergehende vermehrte Speicherung von Triglyzeriden im Fettgewebe sind für die Adipositas charakteristisch [238]. Daher wurde der Einfluß von erhöhten Mengen an Fettsäuren auf die Expression von SOD2 in 3T3-L1 Adipozyten untersucht.

Die Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten in Anwesenheit sowohl von 200 μ M Palmitinsäure (PA), einer gesättigten Fettsäure, als auch von 200 μ M Ölsäure (OA), einer einfach ungesättigten Fettsäure, oder 200 μ M Linolsäure (LA), einer mehrfach ungesättigten Omega-6-Fettsäure, führte zu einer starken Zunahme der SOD2 Expression in diesen Zellen (Abb. 28).

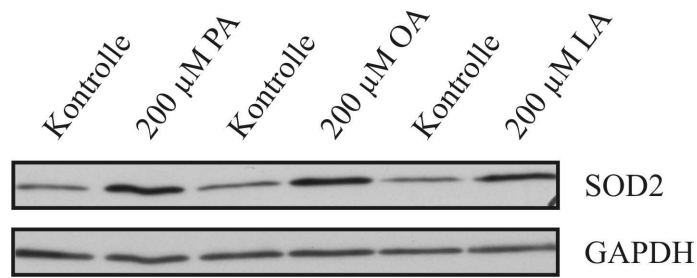


Abbildung 28: Western Blot Analyse der SOD2 Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten, welche unter Zusatz von 200 μ M Palmitinsäure (PA), Ölsäure (OA) oder Linolsäure (LA) differenziert wurden. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Dieser Effekt war dosisabhängig, wie an der sukzessiven Zunahme der SOD2 Proteinexpression in Adipozyten bei Differenzierung in Anwesenheit von 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M Palmitinsäure, Ölsäure bzw. Linolsäure zu erkennen war (Abb. 29A-C).

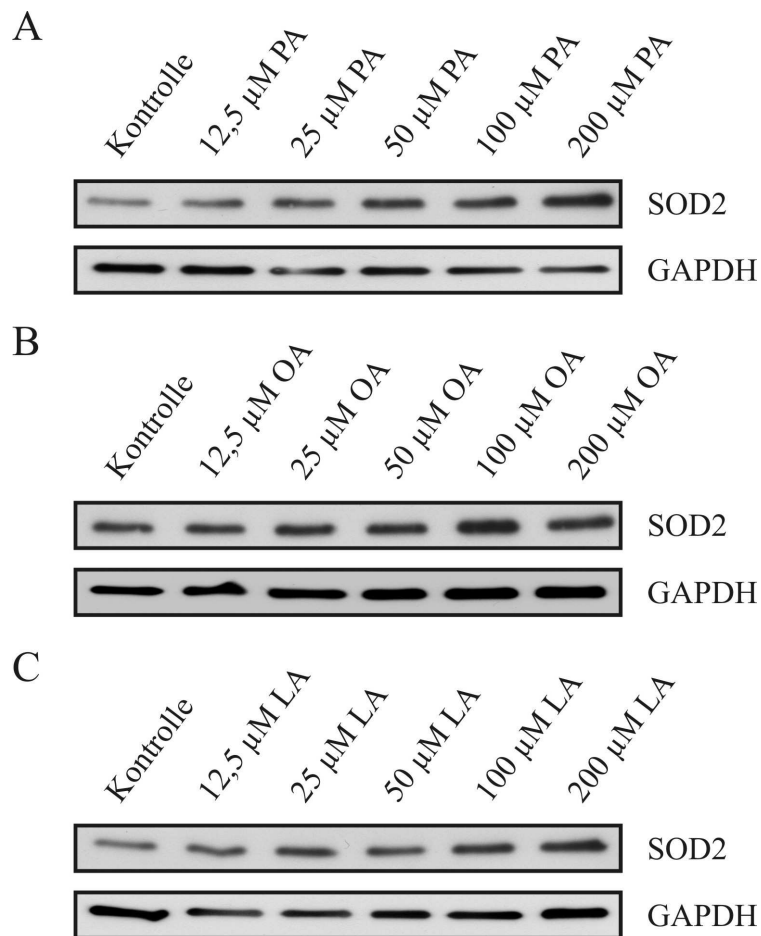


Abbildung 29: Detektion der SOD2 Proteinexpression mittels Immunoblot in 3T3-L1 Adipozyten, welche unter dem Zusatz von 12,5, 25, 50, 100 und 200 μ M Palmitinsäure (PA) (A), Ölsäure (OA) (B) oder Linolsäure (LA) (C) differenziert wurden. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Eine Inkubation von reifen 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit 200 μM und 400 μM dieser Fettsäuren zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Expression der SOD2 (nicht gezeigt).

3.2.2.2.4 Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Adipozyten

Weder eine Stimulation von reifen 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit 100 und 200 μM Metformin noch eine Differenzierung von 3T3-L1 Zellen in Anwesenheit von 100 und 200 μM Metformin führte zu einer Regulation der SOD2 auf Proteinebene (nicht gezeigt). Auch eine Stimulation von reifen 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit 3,75 μM , 7,5 μM und 12,5 μM Pioglitazon, einem PPAR γ Agonisten, hatte keinen Einfluss auf die Expression von SOD2 (nicht gezeigt).

Die Inkubation reifer 3T3-L1 Adipozyten für 24 h mit 10 μM und 50 μM Fenofibrat (FF), einem PPAR α Agonisten, führte jedoch mit beiden verwendeten Konzentrationen zur deutlichen Reduktion der SOD2 Proteinmenge (Abb. 30A). Eine einstündige Vorinkubation der Zellen mit 5 μM RU486 (RU), einem spezifischen PPAR α Antagonisten, war in der Lage die durch Fenofibrat vermittelte Reduktion der SOD2 Expression größtenteils zu blockieren, was für eine Beteiligung von PPAR α an dem reprimierenden Effekt von Fenofibrat spricht (Abb. 30B).

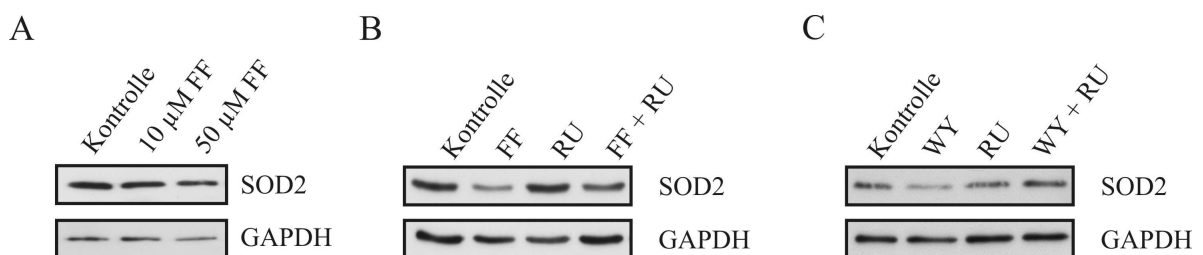


Abbildung 30: Analyse der Proteinexpression von SOD2 mittels Immunoblot in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die 24 h mit 10 und 50 μM Fenofibrat (FF) behandelt wurden (A), bzw. 24 h mit 50 μM Fenofibrat (B) oder 20 μM WY 14643 (WY) (C) ohne oder mit einstündiger Vorbehandlung mit 5 μM RU 486 (RU). GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Dies wurde noch deutlicher bei Verwendung des spezifischen PPAR α Agonisten WY 14643 (WY): hier konnte eine Vorstimulation mit RU486 die Reduktion der SOD2 Proteinexpression vollständig verhindern (Abb. 30C).

3.2.2.2.3 Effekte des Knock-downs der Superoxid-Dismutase 2 in 3T3-L1 Zellen

Da eine starke Zunahme der Expression der Superoxid-Dismutase 2 während der Adipozytendifferenzierung in primären humanen Adipozyten sowie murinen 3T3-L1 Zellen nachgewiesen werden konnte (s. 3.2.2.1 und 3.2.2.2.1), war es von Interesse, die Auswirkungen einer verminderten Expression dieses Proteins während der Adipozytendifferenzierung zu untersuchen. Die Expression der SOD2 wurde daher vor Induktion der Differenzierung durch Transfektion mit 100 nM SOD2 siRNA bzw. Kontroll siRNA am Tag 0 in 3T3-L1 Zellen reprimiert (s. 2.2.1.4.4). Anschließend wurden die Zellen wie üblich gemäß dem Standardprotokoll zu Adipozyten differenziert (s. 2.2.1.4.2).

In reifen 3T3-L1 Adipozyten war nach Behandlung mit SOD2 siRNA wesentlich weniger SOD2 Protein mittels Immunoblot nachzuweisen (Abb. 31). Auch die Expression von PPAR γ war reduziert.

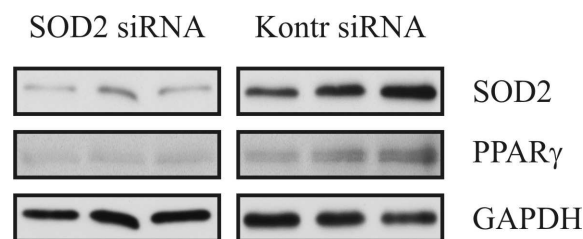


Abbildung 31: Analyse der Proteinexpression von SOD2 und PPAR γ in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM SOD2 si RNA (SOD2 siRNA) bzw. 100 nM Kontroll siRNA (Kontr siRNA) transfiziert wurden. Es sind jeweils drei unterschiedliche Ansätze gezeigt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Übereinstimmend mit der verminderten Expression an PPAR γ zeigte sich bei einem Knock-down der SOD2 eine um etwa 50% verringerte Menge an voll ausdifferenzierten Adipozyten (Abb. 32A). Auch die Lipideinlagerung war in diesen Zellen wesentlich geringer, wie sich durch Färbung der Zellen mit Oil Red O (Abb. 32B) sowie durch Messung der Triglyzeride im Zelllysate (Abb. 33A) nachweisen ließ. So lag in den 3T3-L1 Zellen, in welchen SOD2 mittels siRNA reprimiert wurde, die Menge an Triglyzeriden am Tag 9 der Adipozytendifferenzierung mit $0,18 \pm 0,06$ mg/mg Zellprotein bei nur 35,6% der Kontrollzellen mit $0,53 \pm 0,12$ mg/mg Zellprotein ($p < 0,0001$).

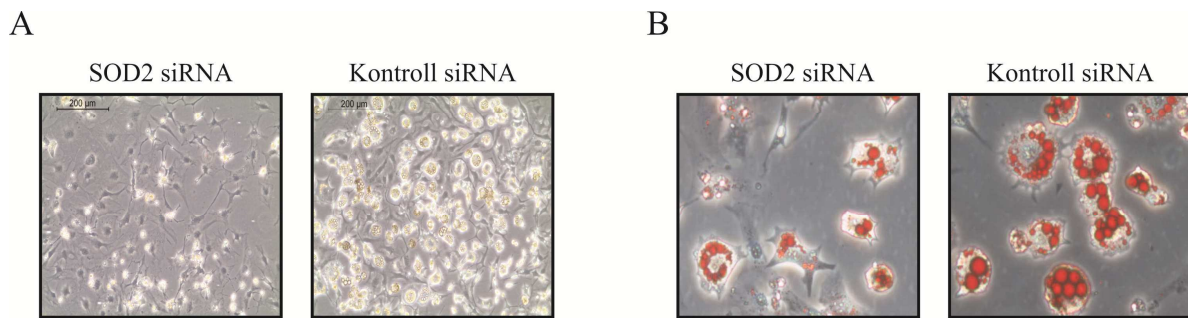


Abbildung 32: Morphologie reifer 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM SOD2 si RNA bzw. 100 nM Kontroll siRNA transfiziert wurden. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme SOD2 siRNA und Kontroll siRNA behandelter 3T3-L1 Adipozyten am Tag 9 (100fache Vergrößerung) und (B) Oil Red O Färbung der Lipidtropfen in SOD2 siRNA und Kontroll siRNA behandelten 3T3-L1 Adipozyten am Tag 9 (400fache Vergrößerung).

Ebenso war die Menge an Adiponektin, welches nur von reifen Adipozyten gebildet und sezerniert wird (s. 3.1.2.2.1), im Zellkulturüberstand differenzierter 3T3-L1 Zellen nach einem Knock-down der SOD2 signifikant reduziert. Am Tag 9 der Differenzierung ließ sich im Überstand von SOD2 siRNA behandelten 3T3-L1 Zellen mit $7,5 \pm 2,7$ ng/ml nur 25,7% der Menge an Adiponektin im Vergleich zu den Kontrollzellen ($30,7 \pm 6,9$ ng/ml) messen ($p < 0,0001$) (Abb. 33B).

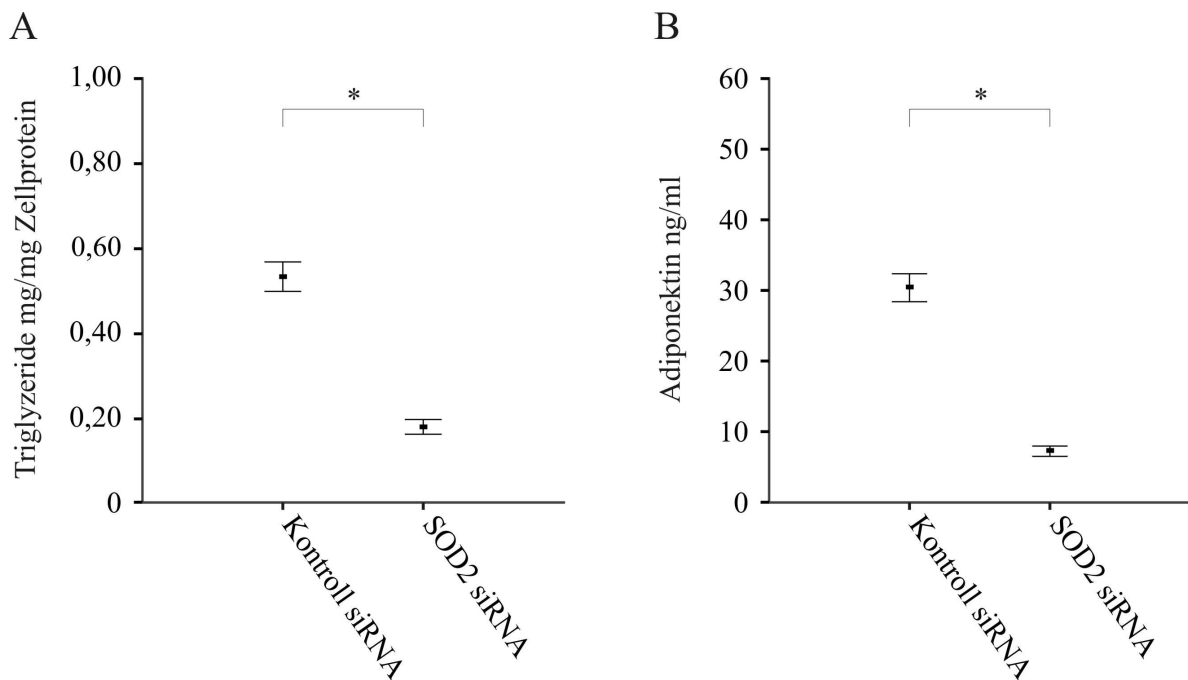


Abbildung 33: Bestimmung der Triglyzeride (A) in den Zelllysaten bzw. von Adiponektin (B) in den Zellkulturüberständen am Tag 9 der Differenzierung von reifen 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit SOD2 siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert wurden. (* $p < 0,05$)

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Knock-down der SOD2 in 3T3-L1 Zellen zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Insulin führt. 3T3-L1 Zellen wurden hierzu vor Induktion der Adipozytendifferenzierung wie oben beschrieben mit SOD2 siRNA bzw. Kontroll siRNA behandelt, und nach Abschluss der Differenzierung am Tag 9 für 20 min mit 50 und 200 nM Insulin stimuliert.

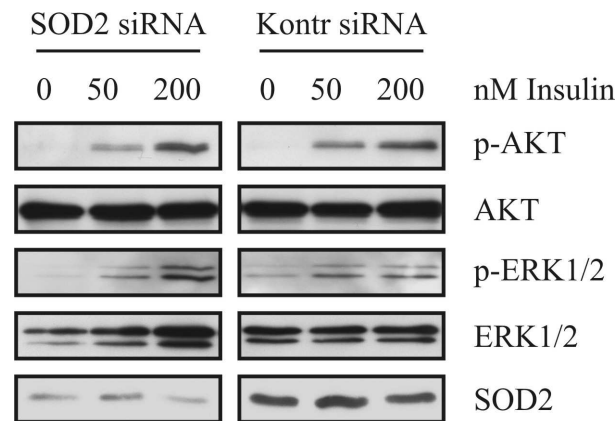


Abbildung 34: Immunoblotanalyse der Proteinexpression von p-AKT, AKT, p-ERK1/2, ERK1/2 und SOD2 nach zwanzigminütiger Stimulation mit 50 und 200 nM Insulin in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM SOD2 siRNA (SOD2 siRNA) bzw. Kontroll siRNA (Kontr siRNA) wurden.

Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, konnte mittels Immunoblot weder in der basalen Expression der Protein Kinase B (AKT) und der *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2), zweier am Insulinsignalweg beteiligter Kinasen, noch in ihrem Aktivierungsgrad, ermittelt am Anteil der Proteine, die eine aktivierende Phosphorylierung aufweisen, ein Unterschied in Abhängigkeit des SOD2 Expressionsniveaus nachgewiesen werden. Dies spricht für eine vergleichbare Insulinsensitivität in den SOD2 siRNA und den Kontroll siRNA behandelten Adipozyten.

3.3 Annexin A6

Annexin A6 ist ein 67 kDa großes Protein und gehört zur Familie der Annexine, welche an Vesikeltransport, Zellteilung, Apoptose, Kalziumsignaltransduktion und Regulation des Zellwachstums beteiligt sind [113]. Eine veränderte Expression von Annexinen wurde in verschiedenen Krankheiten beschrieben, u.a. im Diabetes [114]. Vohl und Kollegen beschrieben in Genexpressionsanalysen des subkutanen und des viszeralen Fettgewebes eine differenzielle Expression von Annexin A2, Annexin A3, Annexin A5 und Annexin A8 [105]. Für Annexin A6 liegen hierzu keine Daten vor. Allerdings wurde eine Regulation von Annexin A6 im Zusammenhang mit der Adipozytengröße, sowie eine Beteiligung am reversen Cholesterintransport und eine verminderte Expression in den peripheren Blutmonozyten von adipösen Personen und Typ 2 Diabetikern gefunden [118-120].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine depotspezifische Expression von Annexin A6 im Fettgewebe untersucht und Funktion und Regulation im Fettgewebe adipöser und diabetischer Tiere sowie in Adipozyten analysiert werden.

3.3.1 Expression von Annexin A6 im Fettgewebe

3.3.1.1 Expression von Annexin A6 im humanen Fettgewebe

In gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von zehn Spendern zeigte eine Immunoblotanalyse eine stärkere Expression von Annexin A6 im viszeralen Fettgewebe. Das exemplarische Ergebnis der Immunoblotanalyse von drei Spendern ist in Abbildung 35 wiedergegeben. Ein Zusammenhang mit Geschlecht, Alter, Adipositas oder Diabetes-erkrankung der Spender war nicht zu erkennen.

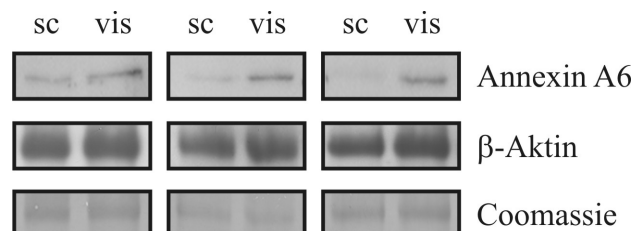


Abbildung 35: Immunoblotanalyse der Annexin A6 Proteinexpression in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes von drei Spendern. Die Expression von β -Aktin sowie die Färbung der Membran mit Coomassie bestätigen eine gleichmäßige Probenbeladung.

3.3.1.2 Expression von Annexin A6 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus

Übereinstimmend mit der depotspezifischen Expression von Annexin A6 im humanen Fettgewebe zeigte auch eine Untersuchung der Proteinexpression von Annexin A6 in gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von männlichen C57BL/6 Mäusen eine stärkere Expression im viszeralen Fettgewebe der Tiere (Abb. 36).

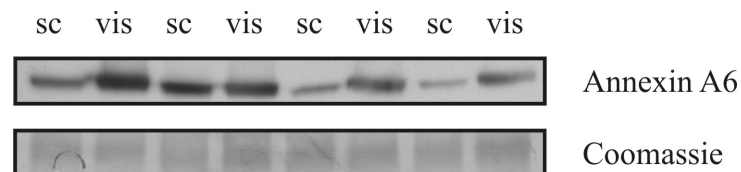


Abbildung 36: Nachweis des Annexin A6 Proteins mittels Immunoblot in den gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von vier C57BL/6 Mäusen. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran bestätigt die gleichmäßige Probenbeladung.

3.3.1.3 Expression von Annexin A6 im viszeralen Fettgewebe der Hochfetttratte

Zudem wurde die Expression von Annexin A6 in Abhängigkeit einer nahrungsbedingten Adipositas untersucht. Im viszeralen Fettgewebe von männlichen Wistar Ratten, welche durch Fütterung einer auf Schweineschmalz basierenden Hochfettdiät (HF) eine Adipositas entwickelten, war im Vergleich zum viszeralen Fettgewebe von schlanken mit einer Standarddiät gefütterten Kontrolltieren (ST) die Expression von Annexin A6 deutlich erhöht (Abb. 37).

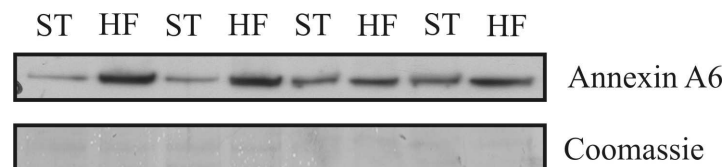


Abbildung 37: Analyse der Annexin A6 Proteinexpression im viszeralen Fettgewebe von schlanken mit Standarddiät gefütterten (ST) und adipösen mit einer auf Schweineschmalz basierenden Hochfettdiät gefütterten (HF) Wistar Ratten mittels Western Blot. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Coomassie-Färbung der Membran sichergestellt.

3.3.1.4 Expression von Annexin A6 im Fettgewebe der Zuckerratte

Zur Untersuchung des Einflusses einer Insulinresistenz auf die Expression von Annexin A6 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe wurden Proben insulinresistiver Zuckerratten (ZDL) und diabetischer Zuckerratten (ZDF) verwendet, welche als Tiermodell eines nicht insulinabhängigen Diabetes gelten.

In gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes war immunchemisch nur in den insulinresistenten schlanken Kontrolltieren eine mit den humanen und murinen Daten übereinstimmende stärkere Expression von Annexin A6 im viszeralen Fettgewebe der Tiere zu erkennen (s. 3.3.1.1 und 3.3.1.2). In den diabetischen Zuckerratten war keine differenzielle Expression von Annexin A6 in den beiden Fettdepots nachzuweisen (Abb. 38A).

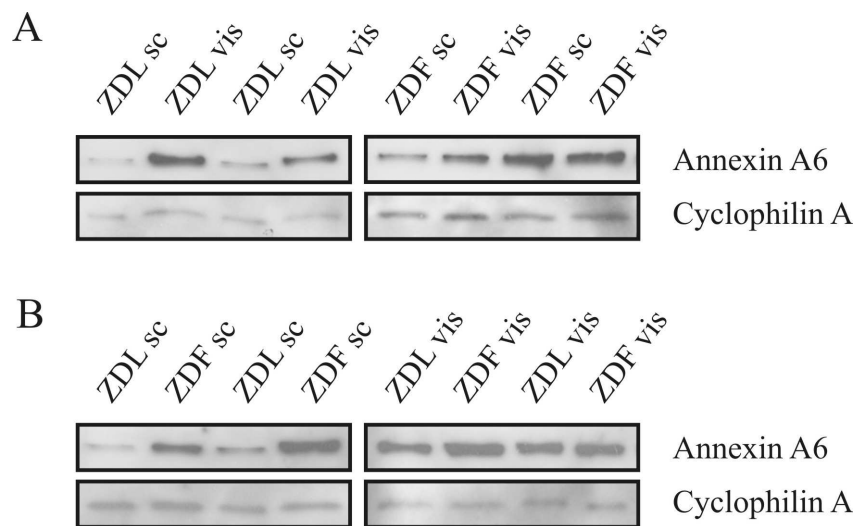


Abbildung 38: Immunoblotanalyse des Annexin A6 Proteins in gepaarten Proben subkutanen (sc) und viszeralen (vis) Fettgewebes (A) bzw. im subkutanen Fettgewebe und viszeralen Fettgewebe (B) nicht diabetischer Kontrolltiere (ZDL) und diabetischer Zuckerratten (ZDF). Als Ladungskontrolle diente Cyclophilin A.

Dieses Ergebnis spiegelt sich bei einem Vergleich der Expression von Annexin A6 im subkutanen bzw. im viszeralen Fettgewebe der nicht diabetischen und der diabetischen Zuckerratten wider. Während in den viszeralen Fettgewebsproben nur ein geringer Unterschied in der Proteinexpression von Annexin A6 detektiert werden konnte, war die deutlich höhere Expression im subkutanen Fettgewebe der insulinresistenten Tiere (Abb. 38A) bei einem direkten Vergleich mit der Expression im subkutanen Fettgewebe der insulinresistenten Tiere deutlich zu sehen (Abb. 38B). Die stark erhöhte Expression von

Annexin A6 im subkutanen Fettgewebe der insulinresistenten Ratten führt somit zu einem Verlust der fettdepotspezifisch differenziellen Expression.

3.3.2 Expression von Annexin A6 in Adipozyten

Da Annexin A6 sowohl im humanen Fettgewebe als auch im Fettgewebe diverser Nagetiermodelle nachgewiesen werden konnte und dort ein fettdepotspezifisches Expressionsmuster aufwies, welches sich in Abhängigkeit von Adipositas bzw. Insulinresistenz veränderte, sollte weiterhin die Expression von Annexin A6 in Adipozyten untersucht werden und Funktion und Regulation in diesen Zellen genauer charakterisiert werden.

3.3.2.1 Expression von Annexin A6 in primären humanen Adipozyten

In isolierten primären humanen Präadipozyten und in vitro differenzierten Adipozyten des subkutanen Fettgewebes dreier Spenderinnen konnte Annexin A6 mittels Immunoblot detektiert werden (Abb. 39). Annexin A6 war sowohl in den Präadipozyten als auch in den reifen Adipozyten exprimiert. Allerdings zeigte sich im Vergleich zu AOX1 und SOD2 eine relativ schwache und nur bei den reifen Adipozyten zweier Spenderinnen nachweisbare Induktion der Annexin A6 Expression (s. 3.1.2.1 und 3.2.2.1).

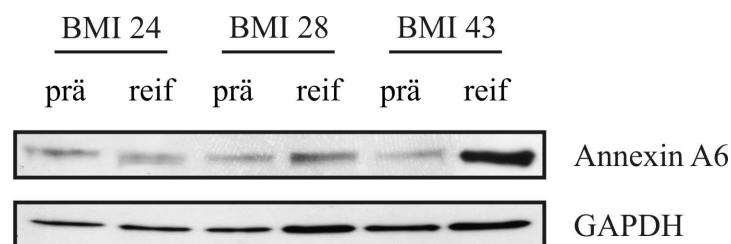


Abbildung 39: Nachweis der Annexin A6 Proteinexpression mittels Immunoblot in subkutanen Präadipozyten (prä) und in vitro differenzierten reifen Adipozyten (reif) dreier Spenderinnen mit unterschiedlichem BMI. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Eine Stimulation reifer humaner Adipozyten aus dem subkutanen Fettgewebe mehrerer Spenderinnen mit Adiponektin in einer Konzentration von 10 µg/ml und mit Metformin in Konzentrationen von 200 und 400 µM zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Annexin A6 (nicht gezeigt).

3.3.2.2 Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten

3.3.2.2.1 Expression von Annexin A6 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten

Die vergleichsweise schwache Induktion von Annexin A6 während der Adipogenese, die in humanen Präadipozyten und Adipozyten zu erkennen war, zeigte sich auch während der in vitro Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten. In 3T3-L1 Präadipozyten war Annexin A6 bereits deutlich exprimiert, um dann im Verlauf der neuntägigen Adipozytendifferenzierung ab Tag 3 kontinuierlich aber nur im geringen Umfang zuzunehmen (Abb. 40).

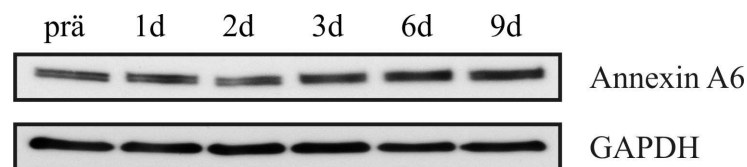


Abbildung 40: Bestimmung der Annexin A6 Proteinexpression mittels Western Blot in 3T3-L1 Präadipozyten (prä), in 3T3-L1 Zellen 1 (1d), 2 (2d), 3 (3d) bzw. 6 (6d) Tage nach Induktion der Adipozytendifferenzierung und in reifen 3T3-L1 Adipozyten (9d). Die Kontrolle der Beladung erfolgte durch Nachweis von GAPDH in denselben Proben.

3.3.2.2.2 Regulation der Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten

3.3.2.2.2.1 Einfluss von LPS auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten

Stimulation von 3T3-L1 Zellen im Verlauf der Adipogenese mit 10 ng/ml LPS führte zu einer Reduktion der Annexin A6 Proteinexpression, die mittels Western Blot immunchemisch in den reifen Adipozyten nachgewiesen werden konnte (Abb. 41).

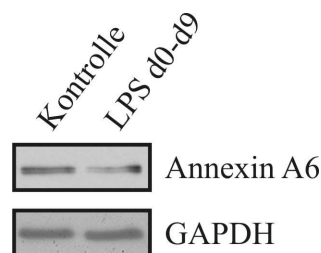


Abbildung 41: Nachweis von Annexin A6 Protein mittels Immunoblot in 3T3-L1 Adipozyten, die während der neuntägigen Differenzierung mit 10 ng/ml LPS stimuliert wurden. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

3.3.2.2.2 Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten

Die Untersuchung eines Einflusses normoglykämischer und hyperglykämischer Bedingungen sowie einer Regulation durch Insulin in Anlehnung an Gegebenheiten, wie sie in der Adipositas und der Insulinresistenz zu finden sind (s. 2.2.1.4.3), zeigte keine Unterschiede in der Expression von Annexin A6 Protein in 3T3-L1 Zellen (nicht gezeigt).

3.3.2.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten

Auch eine Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure in Konzentrationen bis 400 μ M zeigte weder in einem vierundzwanzigstündigen Kurzzeitansatz noch in einem differenzierungsbegleitenden Langzeitansatz einen Einfluss auf die Proteinexpression von Annexin A6 (nicht gezeigt).

3.3.2.2.4 Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten

Die zur Behandlung einer Insulinresistenz eingesetzten Medikamente Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon zeigten keinen Einfluss auf die Expression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten (nicht gezeigt). Während für Pioglitazon keine Daten zu Annexin A6 vorliegen, wurde der fehlende Effekt von Metformin und Fenofibrat auf die Expression von Annexin A6 bereits in primären humanen Blutmonozyten beschrieben [120].

3.3.2.2.3 Effekte der Überexpression von Annexin A6 in 3T3-L1 Zellen

Da für Annexin A6 ein differenzielles Expressionsmuster im subkutanen und viszeralen Fettgewebe nachgewiesen werden konnte, welches sich in Abhängigkeit einer Adipositas und einer Insulinresistenz veränderte, sollte die Funktion von Annexin A6 in Adipozyten durch eine Überexpression in 3T3-L1 Zellen genauer charakterisiert werden.

Die Plasmide für die Überexpression von Annexin A6 in 3T3-L1 Zellen wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Dr. Thomas Grewal zur Verfügung gestellt (s. 2.1.11 und 2.2.1.4.5) [190, 191]. 3T3-L1 Zellen wurden am Tag 1 der Differenzierung entweder mit pcDNA3.1 Annexin A6-GFP zur Expression eines C-terminal mit einem GFP-Tag versehenen Annexin A6 Fusionsproteins bzw. mit pcDNA3.1 GFP als

Kontrollplasmid transfiziert und anschließend gemäß dem Standardprotokoll differenziert und ggf. stimuliert (s. 2.2.1.4.2 und 2.2.1.4.5).

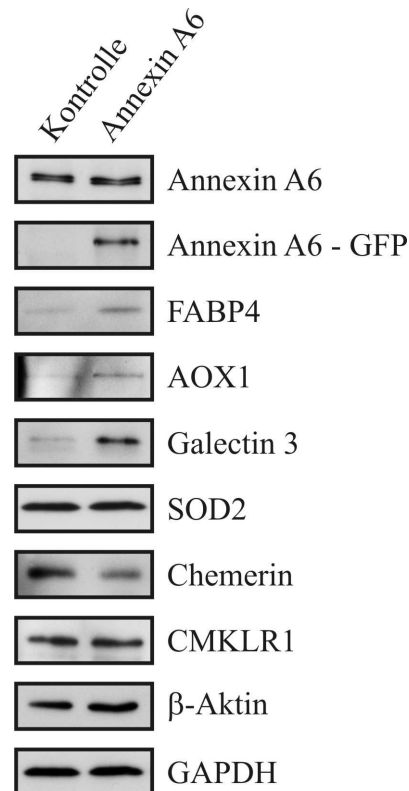


Abbildung 42: Analyse der Proteinexpression von Annexin A6, Annexin A6-GFP, FABP4, AOX1, Galectin 3, SOD2, Chemerin und CMKLR1 mittels Immunoblot in reifen 3T3-L1 Adipozyten, welche einen Tag nach Induktion der Differenzierung mit einem Plasmid zur Überexpression von Annexin A6-GFP bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Der Nachweis von β -Aktin und GAPDH stellte eine gleichmäßige Probenbeladung sicher.

Die Überexpression von Annexin A6 in den 3T3-L1 Zellen wurde am Tag 9 der Adipozytendifferenzierung immunchemisch überprüft. Neben dem endogenen 67 kDa großen Annexin A6 Protein, welches von dem Annexin A6 AK detektiert wurde, konnte in den pcDNA3.1 Annexin A6-GFP transfizierten Zellen mit einem GFP AK auch das exogene ca. 93 kDa große mit einem C-terminalen GFP-Tag versehene Annexin A6 Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 42). In den GFP- Annexin A6 über-exprimierenden Zellen war zudem eine Zunahme von FABP4, AOX1 und Galectin 3 sowie eine leichte Abnahme von Chemerin festzustellen.

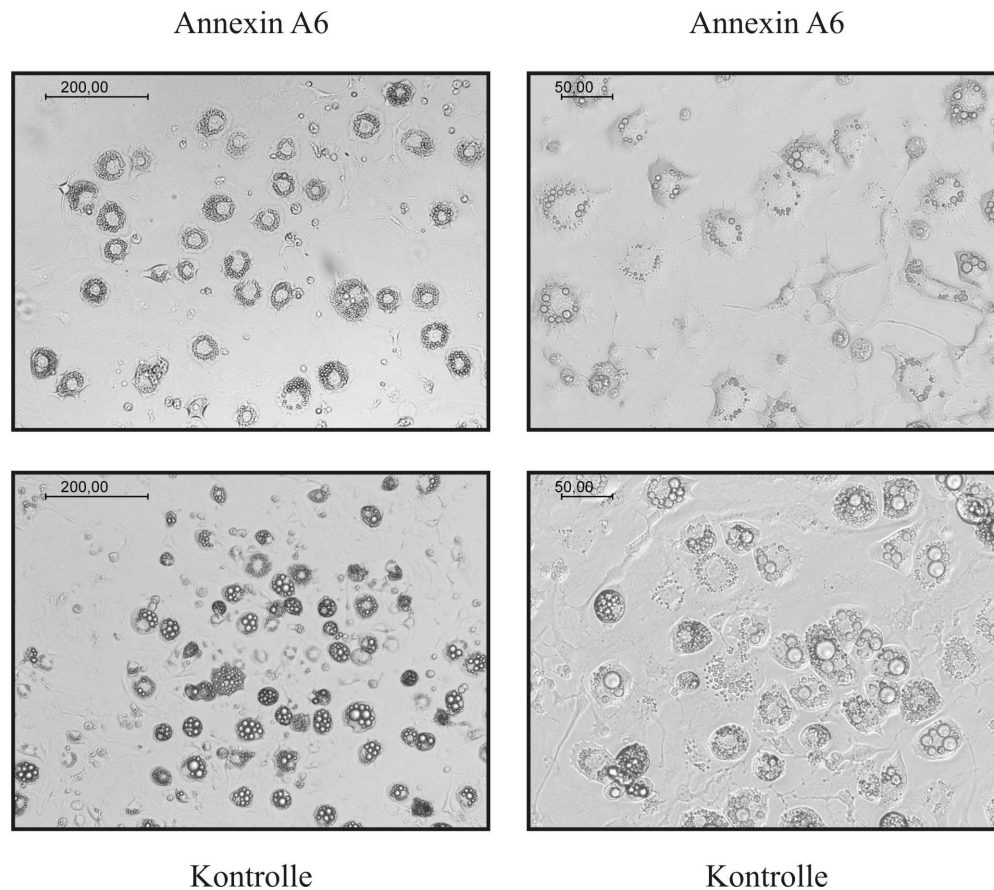


Abbildung 43: Lichtmikroskopische Aufnahme von reifen 3T3-L1 Adipozyten, welche mit einem Plasmid zur Überexpression von Annexin A6-GFP bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. (links: 100fache Vergrößerung, Balken: 200 µm; rechts: 400fache Vergrößerung, Balken: 50 µm)

Morphologisch ließ sich in den Annexin A6 überexprimierenden Zellen in lichtmikroskopischen Aufnahmen eine Veränderung in Größe, Zahl und Anordnung der Lipidtröpfchen erkennen (Abb. 43). Es waren weniger und kleinere Lipidtröpfchen zu sehen, die sich überwiegend ringförmig am Rand der Zellen anordneten. Trotz der nur mäßigen Überexpression von Annexin A6 war also ein deutlicher Phänotyp zu erkennen.

Übereinstimmend mit der geringeren Anzahl an Lipidtröpfchen in den Annexin A6 überexprimierenden 3T3-L1 Zellen konnte auch eine verminderte Speicherung von Triglyzeriden in diesen Zellen beobachtet werden. Am Tag 9 der Differenzierung ließ sich im Zelllysat der Annexin A6 überexprimierenden Zellen mit $0,14 \pm 0,11$ mg/mg Zellprotein im Vergleich zu $0,25 \pm 0,11$ mg/mg Zellprotein nur 63% der Menge an Triglyzeriden nachweisen ($p = 0,019$) (Abb. 44B). Zudem war auch die freigesetzte Menge an Adiponektin in den Zellkulturüberständen dieser Zellen mit $13,3 \pm 8,8$ ng/ml wesentlich geringer als in den Überständen der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen mit $28,0 \pm 14,6$ ng/ml: sie lag bei nur 46% der Kontrollzellen ($p < 0,0001$) (Abb. 44A).

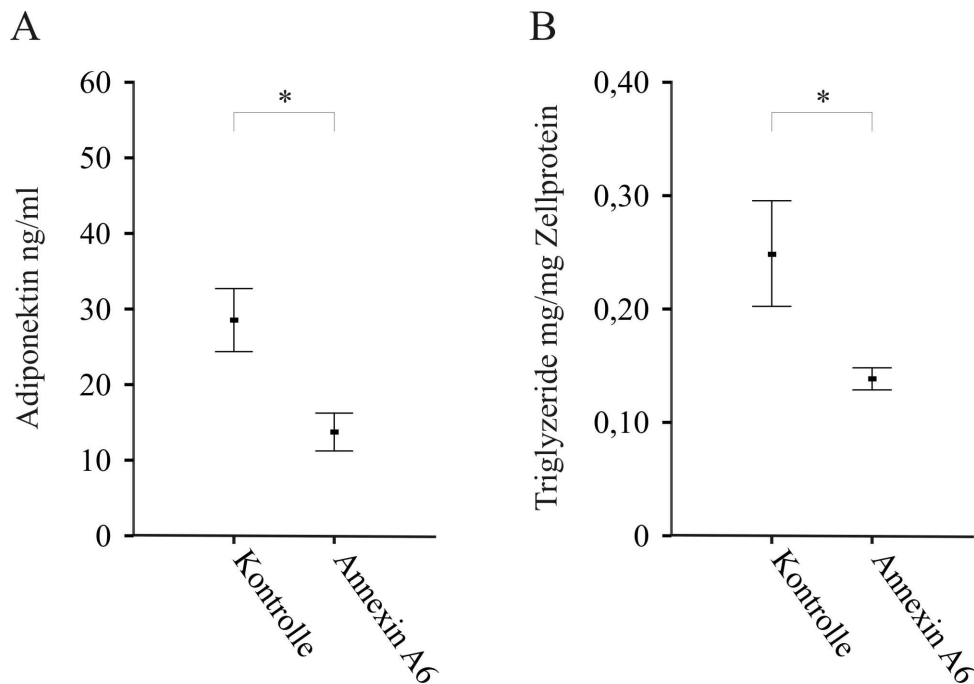


Abbildung 44: Bestimmung von Adiponektin in den Zellkulturüberständen (A) bzw. Bestimmung der Triglyzeride in den Zelllysaten (B) am Tag 9 der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen, welche am Tag 1 nach Induktion der Adipozytdifferenzierung mit einem Kontrollplasmid bzw. einem Plasmid zur Überexpression von Annexin A6-GFP transfiziert wurden. (* $p < 0,05$)

Bei einer Differenzierung von 3T3-L1 Zellen, welche mit pcDNA3.1 Annexin A6-GFP bzw. mit pcDNA3.1 GFP als Kontrollplasmid transfiziert wurden, in Gegenwart von Fettsäuren zeigten die Annexin A6 überexprimierenden Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen weiterhin überwiegend kleinere randständige Lipidtröpfchen und nur vereinzelt größere zentrale Lipidtropfen. In den Kontrollzellen waren vornehmlich Lipidtröpfchen einheitlicher Größe zu erkennen, die sich gleichmäßig über das gesamte Zellvolumen verteilen. In Abbildung 45 sind beispielhaft lichtmikroskopische Aufnahmen von Annexin A6 überexprimierenden 3T3-L1 Adipozyten, welche in Gegenwart von 100 μM Palmitinsäure differenziert wurden, und von entsprechenden Kontrollen wiedergegeben. Eine Stimulation mit Ölsäure und Linolsäure während der Adipogenese führte zu vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt).

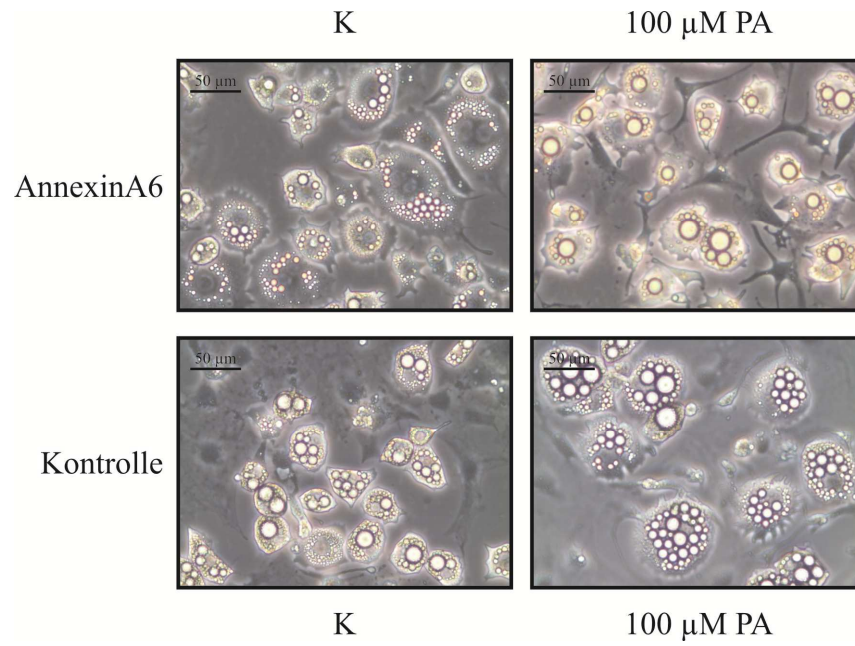


Abbildung 45: Lichtmikroskopische Aufnahme von reifen 3T3-L1 Adipozyten, welche am Tag1 der Differenzierung mit einem Plasmid zur Überexpression von Annexin A6-GFP bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert und anschließend in Gegenwart von 100 μM Palmitinsäure differenziert wurden. (400fache Vergrößerung)

3.4 Omentin

Omentin ist ein kürzlich als Adipozytokin identifiziertes Protein, welches spezifisch von Stromazellen des omentalen Fettgewebes synthetisiert und sezerniert wird [121]. Während Omentin in Zellen als ein 34 kDA großes Monomer vorliegt, kann das sezernierte Omentin im Serum als Trimer von 136 kDA nachgewiesen werden und liegt dort in Konzentrationen von 150 bis 300 ng/ml vor [121-124, 129-131]. In der Adipositas und der Insulinresistenz sind die Serumspiegel von Omentin erniedrigt [130, 131]. In vitro verstärkt rekombinantes Omentin die insulinabhängige Glukoseaufnahme in Adipozyten und aktiviert die AKT [121]. Somit könnte Omentin ein neues insulinsensitivierendes Adipozytokin sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein spezifischer Anti-Omentin Antikörper generiert, und das Protein rekombinant in Insektenzellen exprimiert und gereinigt werden. Anschließend sollte die Wirkung dieses für das viszerale Fettgewebe spezifischen Adipozytokins auf die Leber untersucht werden, insbesondere vor dem Hintergrund der Entstehung einer hepatischen Steatose im Rahmen des Metabolischen Syndroms. Zudem sollte die Expression von Omentin im Fettgewebe des humanen Kollektivs und im Fettgewebe der Nagetiermodelle überprüft werden.

3.4.1 Generierung eines polyklonalen Anti-Omentin Antikörpers

Für die Generierung eines polyklonalen Anti-Omentin Antikörpers wurde ein synthetisches Peptid mit der Sequenz IYQKYPVKYGEKGC verwendet. Diese Sequenz entspricht den Aminosäuren 186 bis 199 des Omentin Proteins, welche sowohl im Menschen als auch in der Maus und der Ratte konserviert sind. Dieses Peptid wurde in einer Auftragsarbeit von der Firma Pineda Antikörperservice (Berlin) für die Immunisierung von Kaninchen verwendet (s. 2.1.7.1). Am Immunisierungstag 145 wurde das Serum der Tiere gewonnen und die IgG Fraktion affinitätsgereinigt. Die Spezifität der IgG-Fraktion wurde mit in vitro translatiertem humanen Omentin Protein überprüft (s. 2.2.4.11). Wie in Abbildung 46 zu sehen ist, erkennt der generierte Anti-Omentin Antikörper sowohl die monomere als auch die dimere und trimere Isoform des Proteins, die sich bei der in vitro Translation spontan ausbilden. Der Antikörper war somit für die spezifische Detektion von Omentin geeignet und wurde für alle folgenden Versuche eingesetzt.

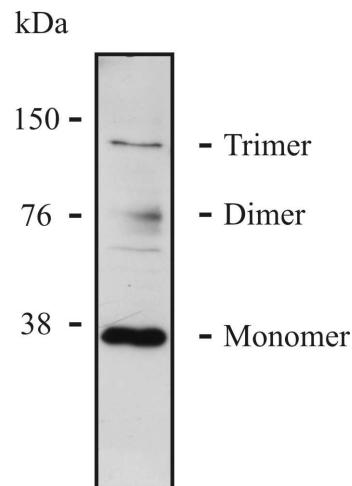


Abbildung 46: Immunoblotanalyse des in vitro translatierten humanen Omentin Proteins mit dem in Kaninchen generierten Peptid-Antikörper gegen Omentin.

3.4.2 Etablierung eines Omentin ELISA

Da Omentin als sekretorisches Protein des Fettgewebes beschrieben wurde, welches von diesem in die Zirkulation abgegeben wird, wurde eine quantitative Erfassung des gelösten Proteins in Zellkulturüberständen, Gewebsexplanten sowie Serumproben angestrebt. Jedoch war der generierte Peptid-Antikörper für den Aufbau eines ELISA nicht geeignet. Ebenso war ein kommerziell erhältlicher ELISA (Apotech) zum quantitativen Nachweis von Omentin nicht verwendbar.

3.4.3 Expression von Omentin im Fettgewebe

3.4.3.1 Expression von Omentin im humanen Fettgewebe

Eine Analyse der mRNA Expression von Omentin im humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebe von fünf Spendern mittels Real-Time RT-PCR bestätigte die beschriebene höhere Expression im viszeralen Fettgewebe [121]. Im viszeralen Fettgewebe war die mRNA Expression von Omentin mit $6,89 \pm 7,02$ im Vergleich zur Expression im subkutanen Fettgewebe mit $0,07 \pm 0,06$ ($p = 0,05$) um ein Vielfaches höher (Abb. 47A).

Eine Untersuchung der Omentin Proteinexpression mittels Immunoblot unter Verwendung des polyklonalen Peptid-AK (s.o.) bestätigte die sehr viel stärkere Expression im viszeralen Fettgewebe auch auf Proteinebene. Es wurden die gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebeproben von insgesamt zehn Spendern analysiert. In Abbildung 47B ist exemplarisch das Ergebnis in den Proben dreier Spender wiedergegeben. Wie hier in den

Fettgewebeproben von zwei Spendern zu erkennen ist, konnte das Omentin Protein im subkutanen Fettgewebe einiger Spender kaum detektiert werden. Ein Zusammenhang der Expression mit Geschlecht, Alter, Adipositas oder Diabeteserkrankung ließ sich in den analysierten Spendern nicht erkennen.

Die höhere Expression von Omentin im viszeralen Fettgewebe sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stimmt mit der aktuellen Datenlage in der Literatur überein [121].

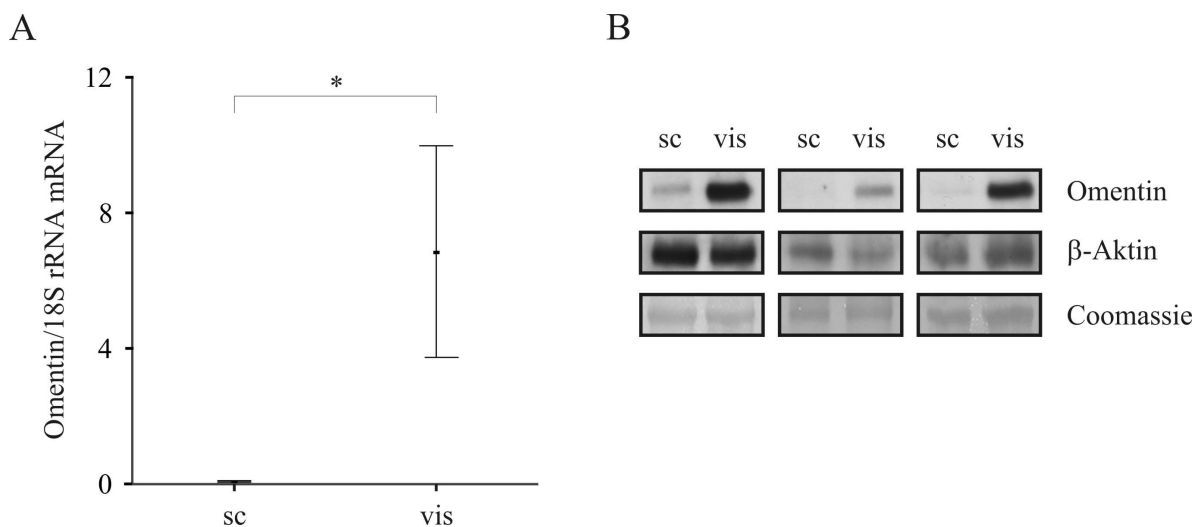


Abbildung 47: mRNA- und Proteinexpression von Omentin in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes. (A) Bestimmung der Omentin mRNA Expression mittels Real-Time RT-PCR im Fettgewebe von fünf Probanden. Die Normalisierung erfolgte mit 18S rRNA. (* $p = 0,05$) (B) Immunoblotanalyse der Proteinexpression von Omentin im Fettgewebe von drei Spendern. Die Expression von β -Aktin sowie die Färbung der Membran mit Coomassie bestätigen eine gleichmäßige Probenbeladung.

3.4.3.2 Expression von Omentin im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus

Eine depotspezifische Expression von Omentin konnte auch im Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden. Wie in den humanen Proben, war Omentin in den murinen Proben im viszeralen Fettgewebe sehr viel stärker exprimiert als im subkutanen Fettgewebe (Abb. 48).

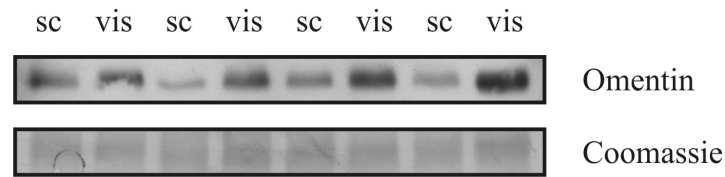


Abbildung 48: Detektion von Omentin mittels Immunoblot in den gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von vier C57BL/6 Mäusen. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran bestätigt die gleichmäßige Probenbeladung.

3.4.3.3 Expression von Omentin im viszeralen Fettgewebe der Hochfettratte

Eine Immunoblotanalyse der Omentin Proteinexpression im viszeralen Fettgewebe von männlichen Wistar Ratten zeigte gegenüber den schlanken mit einer Standarddiät gefütterten Kontrolltieren (ST) eine deutlich höhere Expression in den Tieren, welche durch Fütterung einer auf Schweineschmalz basierenden Hochfett-diät (HF) eine Adipositas entwickelt hatten (Abb. 49).

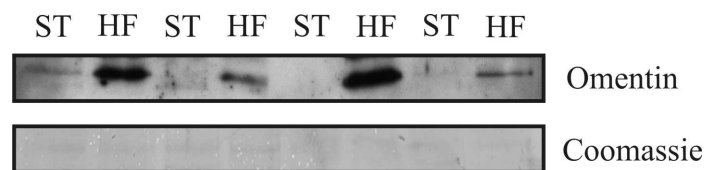


Abbildung 49: Immunoblotanalyse der Omentin Proteinexpression im viszeralen Fettgewebe von schlanken mit Standarddiät gefütterten (ST) und adipösen mit einer auf Schweineschmalz basierenden Hochfett-diät gefütterten (HF) Wistar Ratten mittels Western Blot. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Coomassie-Färbung der Membran sichergestellt.

Demnach nimmt in diesem Tiermodell die Expression von Omentin im Fettgewebe einer nahrungsbedingten Adipositas zusammen mit der Menge an Fettgewebe zu. Ein Nachweis von Omentin mittels Western Blot im Serum dieser Tiere zeigte hingegen keine unterschiedlichen Mengen des Proteins (nicht gezeigt).

3.4.4 Expression und Reinigung von rekombinantem Omentin

Die rekombinante Expression humanen Omentins in H5 Insektenzellen mit dem Bakulovirus Expressionssystem und die anschließende Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins aus den Überständen der infizierten H5 Zellen an Hand seines C-terminalen 6x HN-Tags wurde bereits unter 2.2.5 beschrieben.

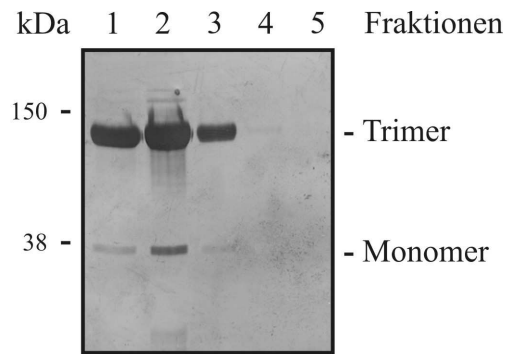


Abbildung 50: Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels mit den Elutionsfraktionen 1-5 der Affinitätsreinigung des rekombinanten humanen Omentins aus den Überständen infizierter H5 Zellen.

Die Reinheit der Elutionsfraktionen der Affinitätsreinigung wurde durch Silberfärbung überprüft. Aliquots der Fraktionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel anschließend silbergefärbt. Das rekombinante humane Omentin war bereits in der ersten Elutionsfraktion in großer Reinheit und hoher Konzentration zu gewinnen. Das gereinigte rekombinante Protein lag hierbei überwiegend in seiner trimeren ca. 110 kDa schweren Isoform vor (Abb. 50).

Die Elutionsfraktionen mit einer hohen Reinheit und einer hohen Konzentration an rekombinanten Protein wurden vereinigt, dialysiert, einer Proteinbestimmung unterzogen und für weitere Experimente bei -80°C aufbewahrt.

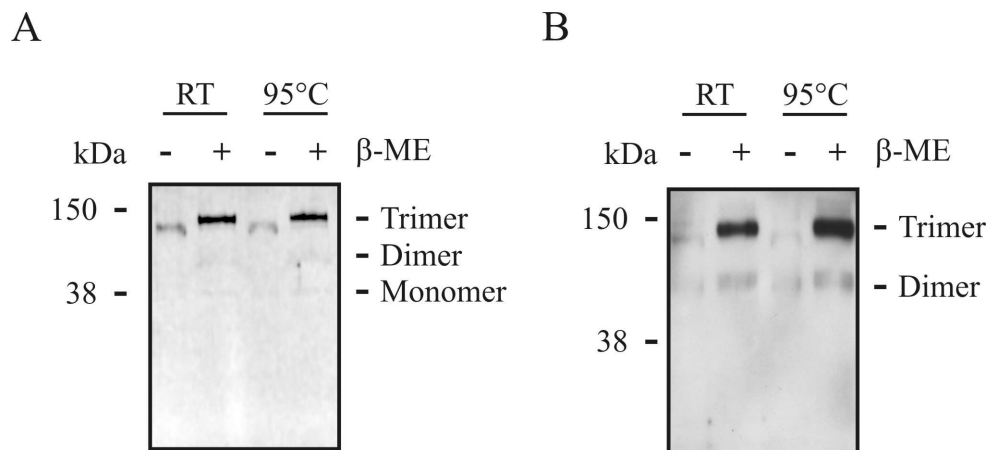


Abbildung 51: Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels (A) bzw. immunchemische Detektion mit Omentin Antikörper (B) von affinitätsgereinigtem rekombinanten humanen 6xHN-Omentin nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) bzw. 95°C mit (+) bzw. ohne (-) Zusatz von β-Mercaptoethanol (β-ME).

Das gereinigte rekombinante Protein wurde in SDS-Probenpuffer bei Raumtemperatur bzw. bei 95°C für 5 min unter bzw. ohne Zusatz von 10% β-Mercaptoethanol zur Reduktion der

Disulfidbrücken inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Silberfärbung (Abb. 51A) bzw. der immunchemische Nachweis mit dem polyklonalen Omentin Antikörper (Abb. 51B) zeigten, dass die trimere Isoform des rekombinanten Omentins sehr stabil war und sich nur in geringem Umfang in die monomere und dimere Isoform überführen ließ. Zudem war der Nachweis mit dem polyklonalen Omentin Antikörper unter reduzierenden Bedingungen sensitiver.

3.4.5 Einfluss von Omentin auf primäre humane Hepatozyten

Des Weiteren sollte der Einfluss von Omentin als sezerniertes Protein des viszeralen Fettgewebes auf Hepatozyten analysiert werden. Hierfür wurde das rekombinant exprimierte Omentin (s.o.) zur Stimulation von primären humanen Hepatozyten (s. 2.2.1.5.2) eingesetzt, und der Einfluss dieser Stimulation mittels Immunoblot, ELISA und GeneChip® Expressionsanalysen untersucht.

Hierfür wurde zunächst in einer Real-Time RT-PCR Analyse sichergestellt, dass Omentin nicht in humanen Hepatozyten exprimiert wird. In Abbildung 52 ist das Ergebnis dieser Analyse wiedergegeben. Während sich im viszeralen humanen Fettgewebe, welches als Positivkontrolle diente, eine Expression von Omentin detektieren ließ, konnte eine mRNA Expression in primären humanen Monozyten und Hepatozyten nicht nachgewiesen werden.

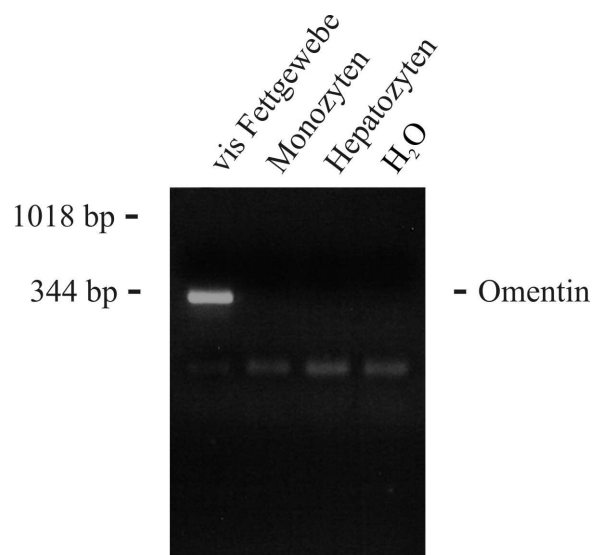


Abbildung 52: Überprüfung der Omentin mRNA Expression in primären humanen Monozyten und Hepatozyten mittels Real-Time RT-PCR. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. cDNA von viszeralem humanen Fettgewebe diente als Positivkontrolle.

Eine biologische Aktivität des rekombinant exprimierten und gereinigten Omentin Proteins konnte durch dessen Erhöhung von Interleukin 8 (IL-8/CXCL8) in den Überständen von primären humanen Hepatozyten und durch eine verstärkte Insulinsignaltransduktion in diesen Zellen nachgewiesen werden.

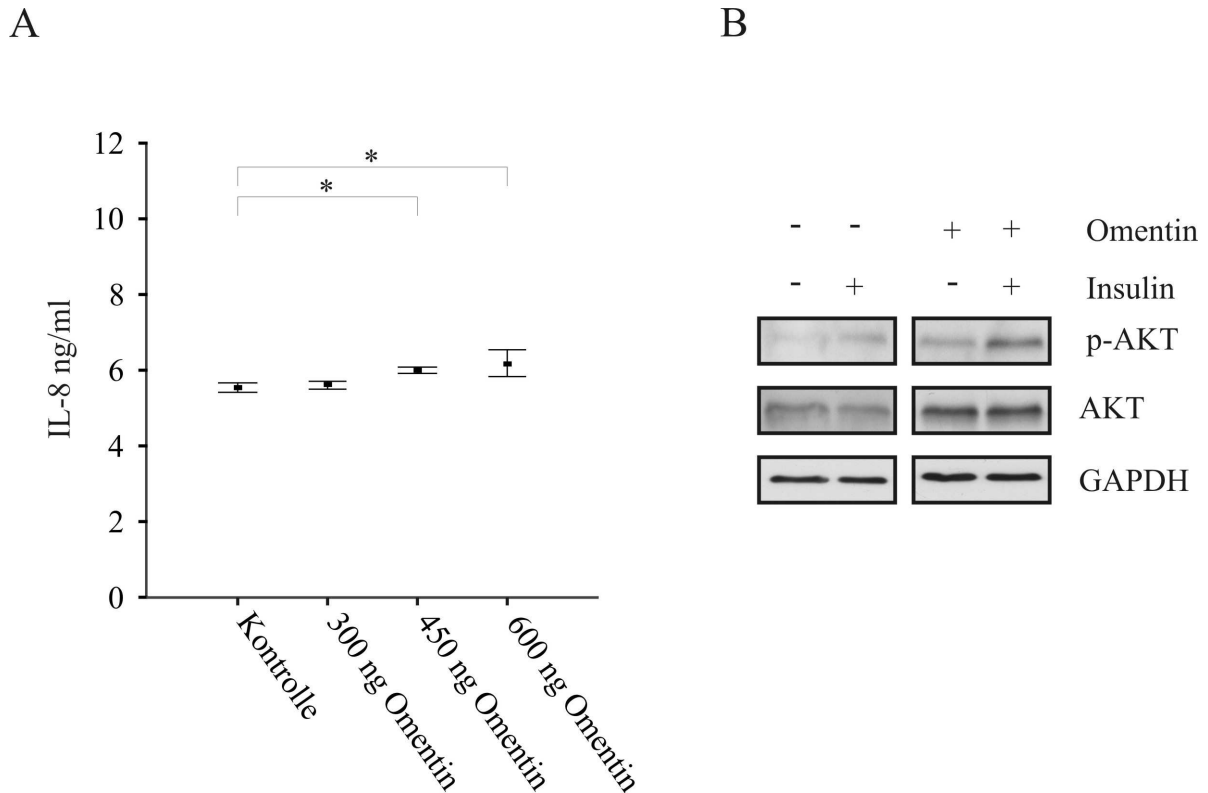


Abbildung 53: Bestimmung von Interleukin 8 (IL-8) in den Zellkulturüberständen von primären humanen Hepatozyten von vier Spendern nach 24 h Stimulation mit 300, 450 und 600 ng/ml rekombinanten Omentin (A). (* p < 0,05) Immunoblotanalyse der Proteinexpression von p-AKT und AKT nach 15 min Stimulation mit 300 ng/ml Omentin und 5 min Stimulation mit 1 nM Insulin in primären humanen Hepatozyten. GAPDH diente als Ladungskontrolle (B).

So sezernierten primäre humane Hepatozyten nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit rekombinantem Omentin in Konzentrationen von 450 und 600 ng/ml mehr proinflammatorisches IL-8. In den Überständen der Hepatozyten konnte im Vergleich zur Kontrolle mit $5,56 \pm 0,24$ ng/ml nach Stimulation mit 300 ng/ml Omentin mit $5,62 \pm 0,18$ ng/ml kein Anstieg der Menge an sezerniertem IL-8 gemessen werden. Bei Verwendung von höheren Konzentrationen Omentin war ein leichter aber signifikanter Anstieg nachweisbar: IL-8 betrug $6,03 \pm 0,17$ ng/ml in den Überständen bei Einsatz von 450 ng/ml Omentin ($p = 0,01$) und $6,19 \pm 0,71$ ng/ml bei Inkubation mit 600 ng/ml Omentin ($p = 0,04$) (Abb. 53A). Hingegen konnte ein Einfluss von Omentin auf die Freisetzung der

Apolipoproteine B-100 und E in den primären humanen Hepatozyten nicht gemessen werden (nicht gezeigt).

Eine fünfzehnminütige Vorstimulation von primären humanen Hepatozyten mit 300 ng/ml rekombinanten Omentin verstärkte die Signaltransduktion von 1 nM Insulin. Dies ließ sich immunchemisch durch einen höheren Anteil phosphorylierten AKT Proteins in den Zelllysaten nachweisen (Abb. 53B). Zudem führte eine Inkubation mit Omentin auch ohne Stimulation mit Insulin zu einer stärkeren Aktivierung von AKT. Eine ähnliche Verstärkung der Insulinsignaltransduktion durch Omentin wurde bereits in primären subkutanen humanen Adipozyten beschrieben [121].

Abkürzung	K vs O (Sp1)	K vs O (Sp2)	K vs O (Sp3)	Genname
GJA3	2,1	3,8	2,9	Connexin 46, CX46
LHFPL3	2,0	2,6	4,1	LHFP-Like Protein 3
LAMA4	2,1	2,4	2,2	Laminin, alpha-4
A_24_P924667	8,5	3,1	2,8	unbekannt
ERCC6L	6,7	3,1	3,5	PIK1-interacting Checkpoint Helicase, PICH
A_23_P972	8,5	18,7	2,4	unbekannt
X86121	3,3	3,1	3,2	mRNA for T Cell Receptor, V beta 1, [X86121]
RP4-724E16.2	2,9	2,1	2,7	Hypothetical Protein FLJ14031
NTRK3	2,1	2,2	2,7	Tyrosine Kinase Receptor C, TRKC

Tabelle 2: Gene, deren Expression in der Genexpressionsanalyse von primären humanen Hepatozyten dreier Spender (Sp 1-3) mittels Affymetrix GeneChips® durch Stimulation mit 300 ng/ml rekombinanten humanen Omentin (O) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (K) mindestens um den Faktor 2 verändert wurde.

Für eine Genexpressionsanalyse von primären humanen Hepatozyten nach Stimulation mit Omentin wurden im Auftrag Affymetrix Human Genome U133_Plus2.0 Arrays durch das Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik, Regensburg, mit der cDNA von Hepatozyten dreier Spender hybridisiert, die 24 h entweder ohne (Kontrolle) oder mit 300 ng/ml rekombinanten humanen Omentin inkubiert worden waren. Eine Auswertung der 55.000 untersuchten Gensonden lieferte nur wenige Kandidatengene, deren Expression durch Omentin induziert bzw. reprimiert war (Tab. 2). IL-8 befand sich nicht unter den regulierten Genen, so dass die nachgewiesene Induktion von IL-8 (Abb. 53A) nicht durch eine vermehrte mRNA Synthese bzw. eine erhöhte mRNA Stabilität erklärt werden kann. Eine Genexpressionsanalyse von primären Hepatozyten, die 24 h mit 300 ng/ml

kommerziell erworbenen rekombinanten humanen Omentin der Firma Alexis (s. 2.1.14) inkubiert wurden, führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Regulation der identifizierten Kandidatengene auf mRNA- und Proteinebene muss noch mittels Real-Time RT-PCR und Immunoblot verifiziert werden.

3.5 Galectin 3

Galectin 3 ist ein β -Galaktosidbindendes Lectin, das intrazellulär als 30 kDa großes Protein im Zytosol und im Zellkern vorliegt und extrazellulär auf Zelloberflächen sowie im Serum nachgewiesen werden kann [139, 141-143]. Galectin 3 wird in zahlreichen Geweben und Zelltypen exprimiert und spielt u.a. eine Rolle in der Vermittlung von Zellmigration, Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktionen sowie in der Regulation der Apoptose [139, 143]. Galectin 3 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen und ist im Serum von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen erhöht [145-151]. Galectin 3 defiziente Mäuse zeigen eine geringere Empfänglichkeit gegenüber der Induktion eines Diabetes, entwickeln jedoch leichter eine NASH [152, 162, 163]. Eine Expression von Galectin 3 in Adipozyten und im Fettgewebe wurde 2007 erstmals durch Kiwaki und Kollegen beschrieben [164]. Sie konnten eine Zunahme der Galectin 3 Expression im epididymalen Fettgewebe von adipösen Mäusen sowie einen stimulatorischen Effekt von Galectin 3 auf die Proliferation von Präadipozyten zeigen.

In dieser Arbeit sollte zunächst eine depotspezifische Expression von Galectin 3 im Fettgewebe sowie die Regulation und Funktion in Adipozyten untersucht werden, und anschließend die Serumkonzentration von Galectin 3 in der Adipositas und im Typ 2 Diabetes bestimmt und der Einfluss von Galectin 3 als Adipozytokin auf die Leber evaluiert werden.

3.5.1 Expression von Galectin 3 im Fettgewebe

3.5.1.1 Expression von Galectin 3 im humanen Fettgewebe

Eine Analyse der Galectin 3 Proteinexpression in gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von zehn Spendern bestätigte die von Kiwaki und Kollegen beschriebene Expression im Fettgewebe und zeigte zudem die höhere Expression von Galectin 3 im viszeralen Fettgewebe auf [164]. In Abbildung 54 ist beispielhaft das Ergebnis der Immunoblotanalyse von Galectin 3 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe von drei Spendern wiedergegeben. Ein Zusammenhang der Galectin 3 Expression mit Geschlecht, Alter, Adipositas oder Diabeteserkrankung der Spender war nicht ersichtlich.

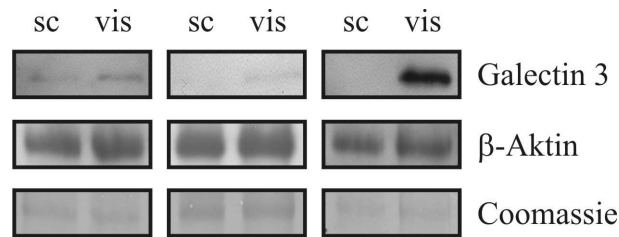


Abbildung 54: Immunoblotanalyse der Galectin 3 Proteinexpression in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes von drei Spendern. Die Expression von β -Aktin sowie die Coomassie-Färbung der Membran bestätigen eine gleichmäßige Probenbeladung.

3.5.1.2 Expression von Galectin 3 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus

In Übereinstimmung mit den humanen Fettgewebeproben zeigte eine Analyse der Proteinexpression von Galectin 3 mittels Western Blot in den gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von männlichen C57BL/6 Mäusen eine stärkere Expression im viszeralen Fettdepot (Abb. 55).

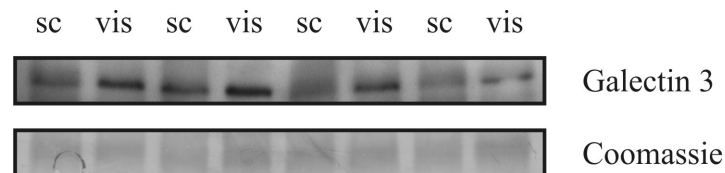


Abbildung 55: Nachweis des Galectin 3 Proteins mittels Immunoblot in den gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebeproben von vier männlichen C57BL/6 Mäusen. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran bestätigt die gleichmäßige Probenbeladung.

Jedoch zeigte sich in den murinen Proben ein insgesamt geringerer Unterschied in der Galectin 3 Expression zwischen den Fettdepots.

3.5.2 Expression von Galectin 3 in Adipozyten

Neben einer Expression von Galectin 3 im humanen subkutanen Fettgewebe und im epidydimalen Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen wurde von Kiwaki und Kollegen auch eine Expression in Adipozyten und Präadipozyten nachgewiesen, welche sie aus humanem subkutanem Fettgewebe isolierten [164]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Ergebnisse bestätigt werden und weiterhin die Expression von Galectin 3 in primären humanen Adipozyten und in der murinen Adipozytenzelllinie 3T3-L1 während der Adipogenese

sowie in Abhängigkeit verschiedener Medikamente und diabetogener Einflüsse genauer analysiert werden.

3.5.2.1 Expression von Galectin 3 in primären humanen Adipozyten

Galectin 3 konnte sowohl in primären humanen Präadipozyten, welche aus dem subkutanen Fettgewebe dreier Spenderinnen mit unterschiedlichem BMI isoliert wurden, als auch in den entsprechenden aus diesen Zellen differenzierten Adipozyten mittels Immunoblot detektiert werden. Es zeigte sich eine starke Induktion des Galectin 3 Proteins in den reifen Adipozyten aller Spenderinnen (Abb. 56).

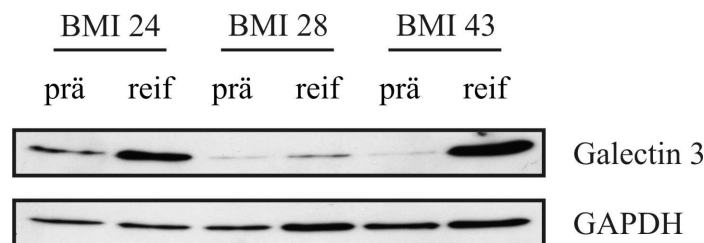


Abbildung 56: Western Blot Analyse der Proteinexpression von Galectin 3 in subkutanen humanen Präadipozyten (prä) und in vitro differenzierten reifen Adipozyten (reif) dreier Spenderinnen mit unterschiedlichen BMI. GAPDH diente als Ladungskontrolle

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit den von Kiwaki und Kollegen detektierten höheren Expression von Galectin 3 in isolierten humanen Präadipozyten [164]. Ob diese Diskrepanz auf unterschiedliche Isolierungs- und Kultivierungsmethoden, auf die in vitro Differenzierung der in dieser Arbeit verwendeten humanen Präadipozyten oder auf den metabolischen Status der Spenderinnen zurückzuführen ist, ist in dieser Arbeit nicht zu klären.

Eine Stimulation von primären humanen Adipozyten aus dem subkutanen Fettgewebe zweier Spenderinnen für 24 h mit 0,2 und 0,4 mM Metformin führte mit beiden eingesetzten Konzentrationen zu einer Reduktion der Galectin 3 Expression (Abb. 57A). Ebenso war die Expression von Galectin 3 in primären humanen Adipozyten nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit 10 µg/ml Adiponektin erniedrigt (Abb. 57B). Sowohl Metformin als auch Adiponektin bewirken eine Aktivierung der AMPK, welche für die Reprimierung von Galectin 3 verantwortlich sein könnte.

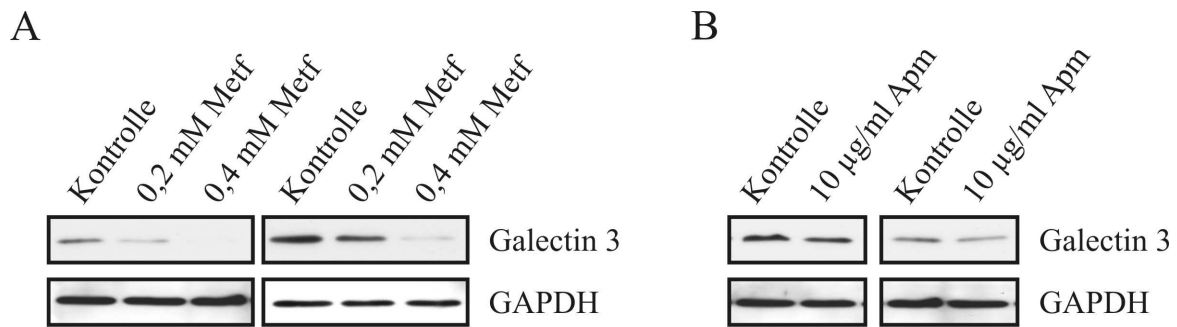


Abbildung 57: Nachweis von Galectin 3 mittels Immunoblot in primären humanen Adipozyten aus dem subkutanen Fettgewebe nach 24 h Stimulation mit 0,2 und 0,4 mM Metformin (Metf) (A) bzw. 10 µg/ml Adiponektin (Apm) (B). Die Kontrolle der Beladung erfolgte durch Nachweis von GAPDH in denselben Proben.

3.5.2.2 Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten

3.5.2.2.1 Expression von Galectin 3 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten

Während sich in reifen humanen Adipozyten eine stärkere Expression von Galectin 3 im Vergleich zu den Präadipozyten nachweisen ließ, zeigte sich in der murinen Adipozytenzelllinie 3T3-L1 eine hohe Expression von Galectin 3 in den Präadipozyten (prä), die bereits einen Tag (1d) nach Induktion der Adipogenese stark abnahm und während der gesamten Differenzierung und in den reifen Adipozyten (9d) auf diesem Niveau blieb (Abb. 58).

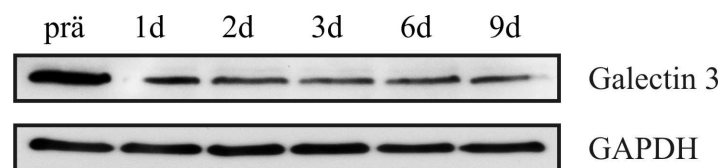


Abbildung 58: Bestimmung der Proteinexpression von Galectin 3 mittels Western Blot in 3T3-L1 Präadipozyten (prä), in 3T3-L1 Zellen 1 (1d), 2 (2d), 3 (3d) bzw. 6 (6d) Tage nach Induktion der Adipozytendifferenzierung und in reifen 3T3-L1 Adipozyten (9d). GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Die höhere Expression von Galectin 3 in Präadipozyten im Vergleich zu reifen Adipozyten deckt sich mit den von Kiwaki und Kollegen publizierten Daten, steht aber nicht im Einklang mit der in den primären humanen Adipozyten detektierten Zunahme von Galectin 3 (s. 3.5.2.1) [164].

3.5.2.2.2 Regulation der Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten

3.5.2.2.2.1 Einfluss von LPS auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten

Galectin 3 ist in der Lage LPS zu binden [239]. Zum Einfluss von LPS auf die Expression von Galectin 3 liegen bereits in anderen Zellen Daten vor: während eine LPS Exposition der intestinalen epithelialen Zelllinie Caco-2 zu einer starken Induktion von Galectin 3 führt, inhibiert eine klassische Aktivierung von Makrophagen mit LPS die Expression und Sekretion von Galectin 3 [240, 241].

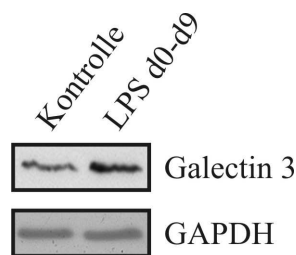


Abbildung 59: Immunoblotanalyse von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten, welche während der neuntägigen Differenzierung mit 10 ng/ml LPS stimuliert wurden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Eine Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten in Gegenwart von 10 ng/ml LPS führte zu einer starken Zunahme von Galectin 3 in den reifen Adipozyten (Abb. 59).

3.5.2.2.2.2 Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten

Kultivierung von reifen 3T3-L1 Zellen im Anschluss an die Differenzierung für drei Tage unter hyperglykämischen Bedingungen (HG, 25 mM Glukose) führte im Vergleich zur Kultivierung unter normoglykämischen Bedingungen (NG, 5 mM Glukose) nicht zu einer Veränderung der Galectin 3 Proteinexpression (nicht gezeigt).

Bei einer nachfolgenden vierundzwanzigstündigen Stimulation mit 0,2 bzw. 2 μ M Insulin zeigte sich unter physiologischen Mengen von Glukose bereits bei der niedrigeren Insulinkonzentration eine Zunahme von Galectin 3 in den 3T3-L1 Adipozyten, während unter hyperglykämischen Versuchsbedingungen die höhere Konzentration von Insulin nur zu einer schwachen Induktion führte (Abb. 60).

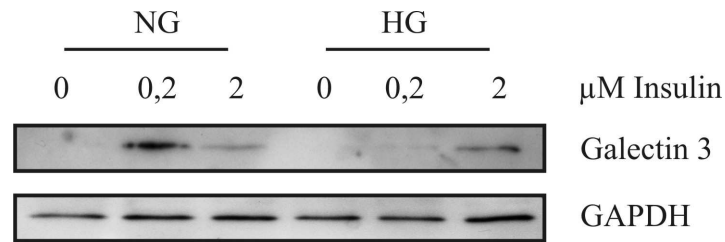


Abbildung 60: Immunoblotanalyse der Galectin 3 Proteinexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten nach dreitägiger Kultivierung unter normo- bzw. hyperglykämischen (NG bzw. HG) Bedingungen und anschließender Stimulation mit 0,2 und 2 μM Insulin für 24 h. Der Nachweis der GAPDH Proteinexpression diente der Ladungskontrolle.

3.5.2.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten

Eine Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten in Gegenwart sowohl von Palmitinsäure, einer gesättigten Fettsäure, als auch von Ölsäure, einer einfach ungesättigten Fettsäure, oder Linolsäure, einer mehrfach ungesättigten Omega-6-Fettsäure, führte bei einer Konzentration von 200 μM zu einer starken Induktion der Galectin 3 Expression (Abb. 61). Bei einer höheren Konzentration von 400 μM der Fettsäuren (Abb. 61) konnte ebenso wie bei einer vierundzwanzigstündigen Stimulation der reifen 3T3-L1 Adipozyten mit 200 und 400 μM der Fettsäuren kein Einfluss auf Galectin 3 detektiert werden (nicht gezeigt).

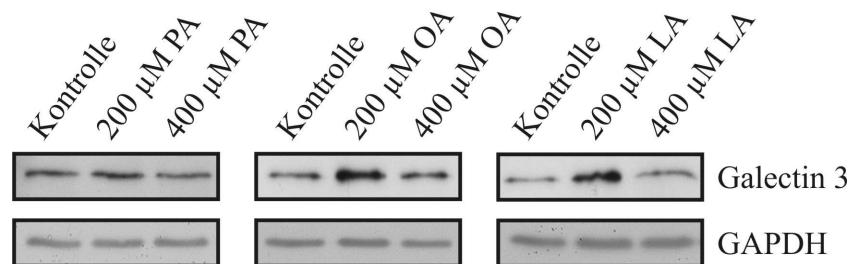


Abbildung 61: Western Blot Analyse der Galectin 3 Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten, welche unter Zusatz von 200 und 400 μM Palmitinsäure (PA), Ölsäure (OA) bzw. Linolsäure (LA) differenziert wurden. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Die Induktion der Galectin 3 Expression bei Differenzierung der 3T3-L1 Adipozyten unter Zusatz von Fettsäuren war dosisabhängig, wie in Abbildung 62 zu erkennen ist. Die Differenzierung zu Adipozyten in Anwesenheit von 12,5, 25, 50, 100 und 200 μM Palmitinsäure (Abb. 62A), Ölsäure (Abb. 62B) bzw. Linolsäure (Abb. 62C) führte zu einer sukzessiven Zunahme des Galectin 3 Proteins in den Zellen. Palmitinsäure und Ölsäure bewirkten bereits in einer Konzentration von 100 μM die höchste Induktion von Galectin 3,

während Linolsäure in einer Konzentration von 200 μM in der Lage war die Expression von Galectin 3 sogar noch weiter zu steigern.

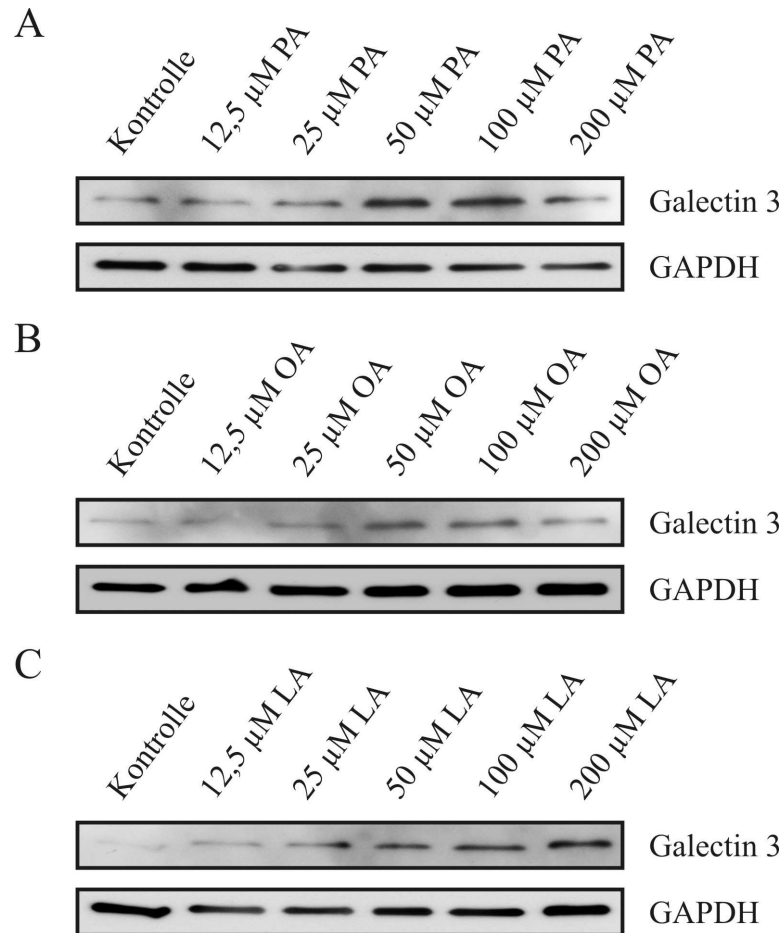


Abbildung 62: Detektion von Galectin 3 Protein mittels Immunoblot in 3T3-L1 Adipozyten, welche in Gegenwart von 12,5, 25, 50, 100 und 200 μM Palmitinsäure (PA) (A), Ölsäure (OA) (B) oder Linolsäure (LA) (C) differenziert wurden. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet.

3.5.2.2.4 Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression von Galectin 3 in 3T3-L1 Adipozyten

Eine Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten für 24 h sowohl mit dem PPAR α Agonisten Fenofibrat in Konzentrationen von 10 und 50 μM also auch mit dem PPAR γ Agonisten Pioglitazon in Konzentrationen von 3,75, 7,5 und 12,5 μM hatte keinen Einfluss auf die Expression von Galectin 3 (nicht gezeigt). Eine vierundzwanzigstündige Inkubation mit 0,1 und 0,2 mM Metformin bewirkte in den 3T3-L1 Adipozyten im Gegensatz zu den humanen Adipozyten (s. 3.5.2.1) ebenfalls keine Veränderung der Galectin 3 Proteinexpression (nicht gezeigt). Dies könnte jedoch an dem Einsatz geringerer Mengen Metformin liegen.

3.5.2.2.3 Effekte des Knock-downs von Galectin 3 in 3T3-L1 Zellen

Da die Expression von Galectin 3 spezifisch für das viszerale Fettgewebsdepot war (s. 3.5.1.1 und 3.5.1.2), während der Adipogenese reguliert war (s. 3.5.2.1 und 3.2.2.2.1) und sich in Adipozyten durch verschiedene diabetogene Stimuli sowie durch Metformin und Adiponektin beeinflussen ließ (s. 3.5.2.2.2), wurde in weiteren Versuchen die Auswirkung einer Galectin 3 Defizienz in 3T3-L1 Adipozyten untersucht. Hierfür wurde die Expression des Galectin 3 Proteins durch Transfektion der 3T3-L1 Zellen am Tag 0 vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM Galectin 3 siRNA unterdrückt (s. 2.2.1.4.4). Anschließend wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll zu Adipozyten differenziert (s. 2.2.1.4.2).

In den reifen 3T3-L1 Adipozyten war am Tag 9 nach Behandlung mit Galectin 3 siRNA nicht nur deutlich weniger Galectin 3 exprimiert als in den mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen, sondern auch deutlich weniger FABP4 Protein nachweisbar (Abb. 63).

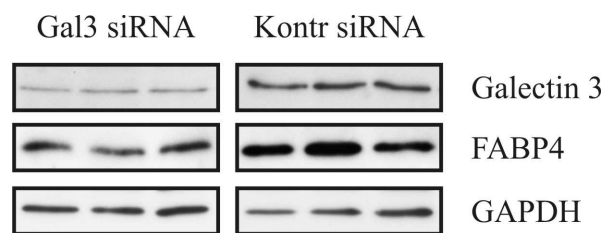


Abbildung 63: Immunoblotanalyse der Galectin 3 und FABP4 Proteinexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten, welche vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM Galectin 3 siRNA (Gal3 siRNA) bzw. Kontroll siRNA (Kontr siRNA) transfiziert wurden. Es sind jeweils drei unterschiedliche Ansätze gezeigt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Überexpression von Annexin A6 in 3T3-L1 Adipozyten führte hingegen zu einer erhöhten Expression von Galectin 3, die von einer Induktion von FABP4 begleitet war (s. 3.3.2.2.3). Inwieweit die koordinierte Expression von Galectin 3 und FABP4 in diesen Experimenten auf eine gemeinsame Regulation der beiden Proteine zurückzuführen ist, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Einhergehend mit der geringeren Expression von FABP4 wiesen die 3T3-L1 Adipozyten bei einem Knock-down von Galectin 3 einen geringeren Differenzierungsgrad auf (Abb. 64A) und bildeten weniger Lipidtröpfchen aus (Abb. 64B).

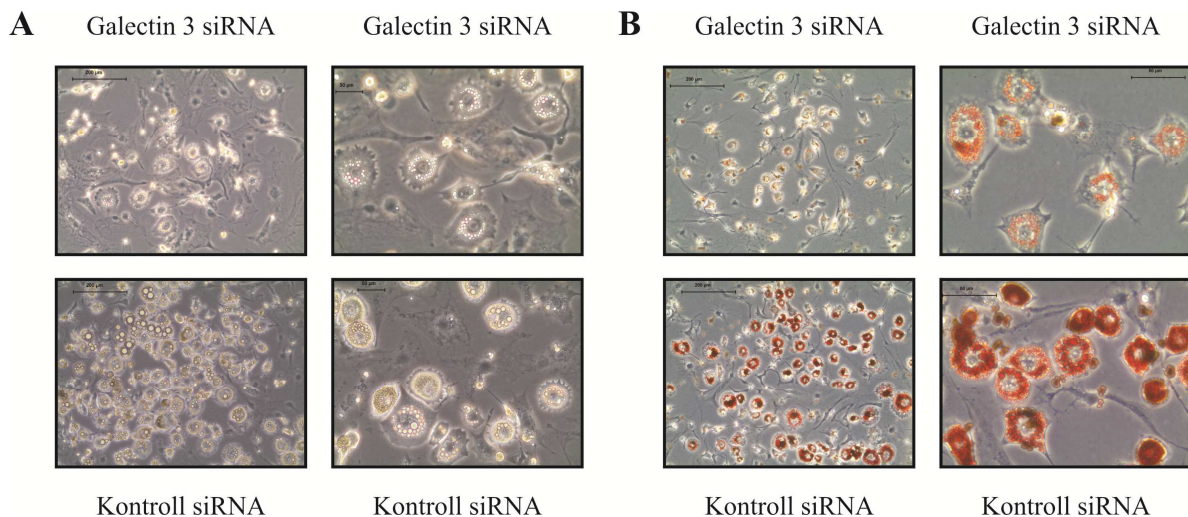


Abbildung 64: Morphologie reifer 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM Galectin 3 si RNA bzw. 100 nM Kontroll siRNA transfiziert wurden. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme Galectin 3 siRNA und Kontroll siRNA behandelter 3T3-L1 Adipozyten am Tag 9 und (B) Oil Red O Färbung der Lipidtropfen in Galectin 3 siRNA und Kontroll siRNA behandelten 3T3-L1 Adipozyten am Tag 9. Bilder rechts jeweils 100fache Vergrößerung, Bilder links jeweils 400fache Vergrößerung.

Die geringere Differenzierung der Zellen und die verminderte Einlagerung von Triglyzeriden konnte auch durch die Bestimmung des in den Zellkulturüberstand sezernierten Adiponektins und der Menge an gespeicherten Triglyzeriden in den Zellen bestätigt werden (Abb. 65). So sezernierten die Galectin 3 siRNA behandelten 3T3-L1 Adipozyten mit $8,6 \pm 7,2$ ng/ml Adiponektin im Zellkulturüberstand nur 22% der Menge an Adiponektin der Kontroll siRNA behandelten Zellen mit $39,1 \pm 3,2$ ng/ml ($p < 0,0001$) (Abb. 65A). Die Menge der in den 3T3-L1 Adipozyten eingelagerten Triglyzeriden betrug bei Knock-down der Galectin 3 Proteinexpression mit $0,08 \pm 0,05$ mg/mg Zellprotein nur 12 % der Kontrollzellen mit $0,87 \pm 0,57$ mg/mg Zellprotein ($p = 0,017$) (Abb. 65B).

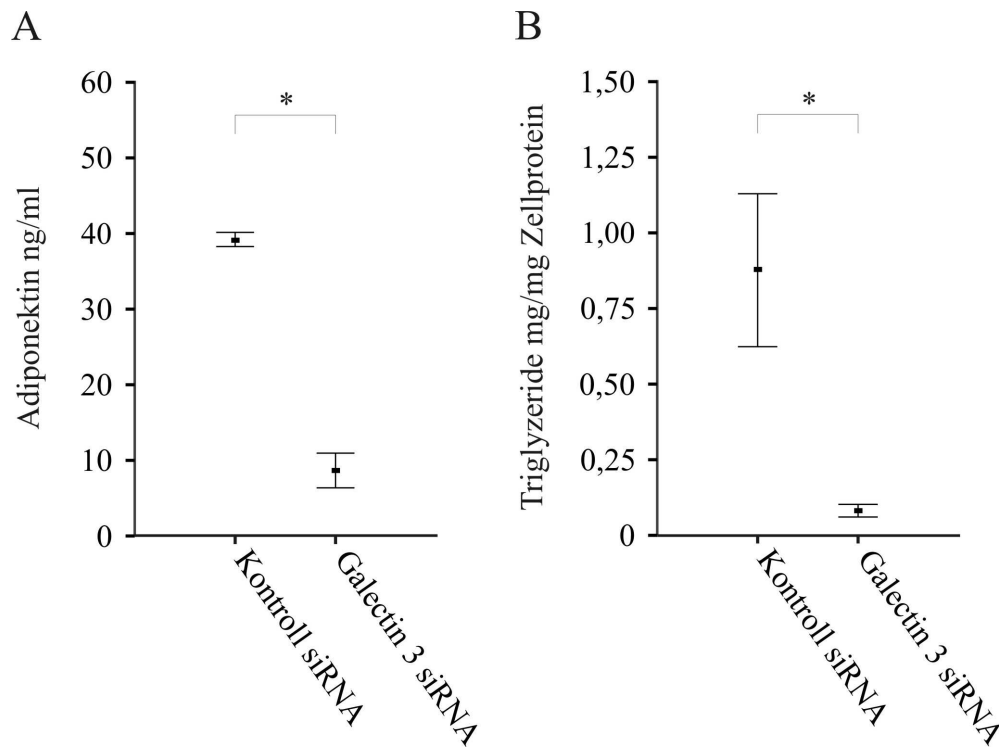


Abbildung 65: Bestimmung von Adiponektin in den Zellkulturüberständen (A) bzw. Bestimmung der Triglyzeride in den Zelllysaten (B) am Tag 9 der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten, welche vor Induktion der Differenzierung mit Galectin 3 siRNA bzw. Kontroll siRNA behandelt wurden. (* $p < 0,05$)

Bei einer Stimulation von Galectin 3 siRNA behandelten 3T3-L1 Adipozyten nach Abschluss der Differenzierung am Tag 9 für 20 min mit 50 und 200 nM Insulin konnte keine Veränderung in der Sensitivität der Zellen gegenüber Insulin im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten Zellen nachgewiesen werden.

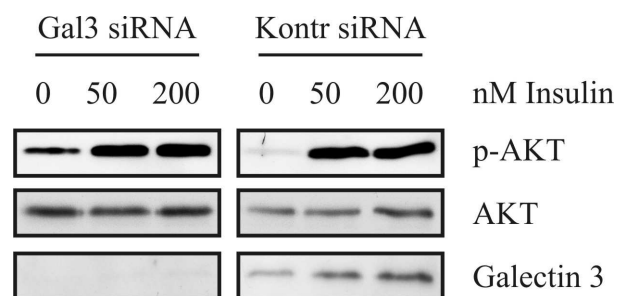


Abbildung 66: Immunoblotanalyse der Proteinexpression von p-AKT, AKT und Galectin 3 nach zwanzigminütiger Stimulation mit 50 und 200 nM Insulin in reifen 3T3-L1 Adipozyten, die vor Induktion der Differenzierung mit 100 nM Galectin 3 siRNA (Gal3 siRNA) bzw. 100 nM Kontroll siRNA (Kontr siRNA) transfiziert wurden.

Wie in Abbildung 66 dargestellt ist, war in Zellen mit einer geringeren Galectin 3 Expression die basale Menge von AKT geringfügig erhöht. Bei Stimulation mit Insulin

konnte in diesen Zellen jedoch kein Unterschied in dem Phosphorylierungsniveau der AKT detektiert werden. Auch die Expression und Aktivierung der ERK1/2 war unverändert (nicht gezeigt).

3.5.3 Galectin 3 im humanen Serum

Galectin 3 wird in verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert und als lösliches Protein sowohl in den Extrazellulärraum als auch in das Blut abgegeben [139]. Der Nachweis von Galectin 3 in Adipozyten und die höhere Expression von Galectin 3 im humanen viszeralen Fettgewebe (s. 3.5.1.1) legten eine Untersuchung der Serumspiegel dieses neuen Adipozytokins im Zusammenhang mit Adipositas und Typ 2 Diabetes nahe [164]. Des Weiteren sollte der Beitrag des viszeralen Fettgewebes am systemischen Galectin 3 durch Messung des Proteins im Pfortaderblut evaluiert werden, wie dies bereits für einige wenige andere Adipozytokine erfolgte [50].

Für die Analyse der Galectin 3 Serumspiegel in der Adipositas und im Typ 2 Diabetes mellitus wurden die Serumproben zweier Probandengruppen verwendet: zum einen Proben der Probandengruppe 1 bestehend aus 23 normalgewichtigen ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), 30 übergewichtigen ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) und 30 Typ 2 diabetischen Männern (Tab. 3) zum anderen Proben der Probandengruppe 2 bestehend aus 45 Frauen und 55 Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus (Tab. 5) (s. 2.2.8.1).

Die Bestimmung von Galectin 3 mittels ELISA im Serum der Probandengruppe 1 (Tab. 3) zeigte, dass die Galectin 3 Serumkonzentration der Typ 2 Diabetiker und der übergewichtigen Kontrollen hoch war. Im Vergleich mit den normalgewichtigen Kontrollen war Galectin 3 in den Typ 2 Diabetikern und den übergewichtigen Kontrollen jedoch signifikant erhöht (Tab. 3 und Abb. 67A).

	T2D	ÜG	NG	p-Wert
Anzahl	30	30	24	
Alter (Jahre)	66 (48-88)	58 (41-79)	54 (40-73)	0,028 ¹ , 0,011 ²
BMI (kg/m ²)	30,7 (21,2-40,0)	27,8 (25,0-35,5)	23,9 (20,0-24,9)	0,043 ¹ , <0,001 ^{2,3}
WHR	1,05 (0,87-1,35)	1,01 (0,90-1,14)	0,92 (0,83-1,10)	0,004 ¹ , <0,001 ^{2,3}
Glukose (mmol/l)	7,71 (3,83-13,81)	4,66 (3,50-6,55)	4,71 (3,89-6,44)	<0,001 ^{1,3}
HDL (mmol/l)	1,01 (0,54-1,40)	1,35(0,88-2,07)	1,37 (1,09-2,07)	<0,001 ^{1,3}
LDL (mmol/l)	3,81 (2,12-5,64)	4,69 (2,69-8,13)	4,76 (2,80-7,36)	0,006 ¹ , 0,004 ³
CRP (mg/l)	4,2 (0,2-42,6)	2,0 (0,3-40,1)	0,7 (0,2-8,6)	0,001 ² , <0,001 ³
Medikamente				
ACEI	12	8	1	
ARB	6			
Betablocker	14	3	1	
Diuretika	20	9	1	
Lipidsenker	14	10	2	
Insulin	10			
Urikostatika	10	1	1	
Metformin	12			
Sulfonylharnstoff	6			
Digitalis	7			
Adipozytokine				
Adiponektin (µg/ml)	2,6 (0,8-7,0)	2,8 (1,2-6,4)	2,6 (1,0-9,4)	
Leptin (ng/ml)	12,6 (3,4-82,9)	5,7 (1,8-26,5)	3,3 (1,2-14,6)	0,005 ¹ , 0,013 ² , <0,001 ³
Restistin (ng/ml)	17,9 (10,3-38,4)	9,6 (5,9-18,3)	9,7 (3,6-17,8)	<0,001 ^{1,3}
Galectin 3 (ng/ml)	5,6 (3,8-8,8)	5,4 (3,5-8,1)	4,8 (2,9-6,2)	0,009 ² , 0,003 ³

Tabelle 3: Anthropometrische und metabolische Daten der Probandengruppe 1 bestehend aus normalgewichtigen Männern (BMI \leq 25 kg/m², NG), übergewichtigen Männern (BMI > 25 kg/m², ÜG) und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2D).
p-Werte: ¹ T2D gegen ÜG, ² ÜG gegen NG, ³ T2D gegen NG.
Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACEI), Angiotensin II Receptor Blocker (ARB), Body Mass Index (BMI), C-Reactive Protein (CRP), High-Density Lipoprotein (HDL), Low-Density Lipoprotein (LDL).

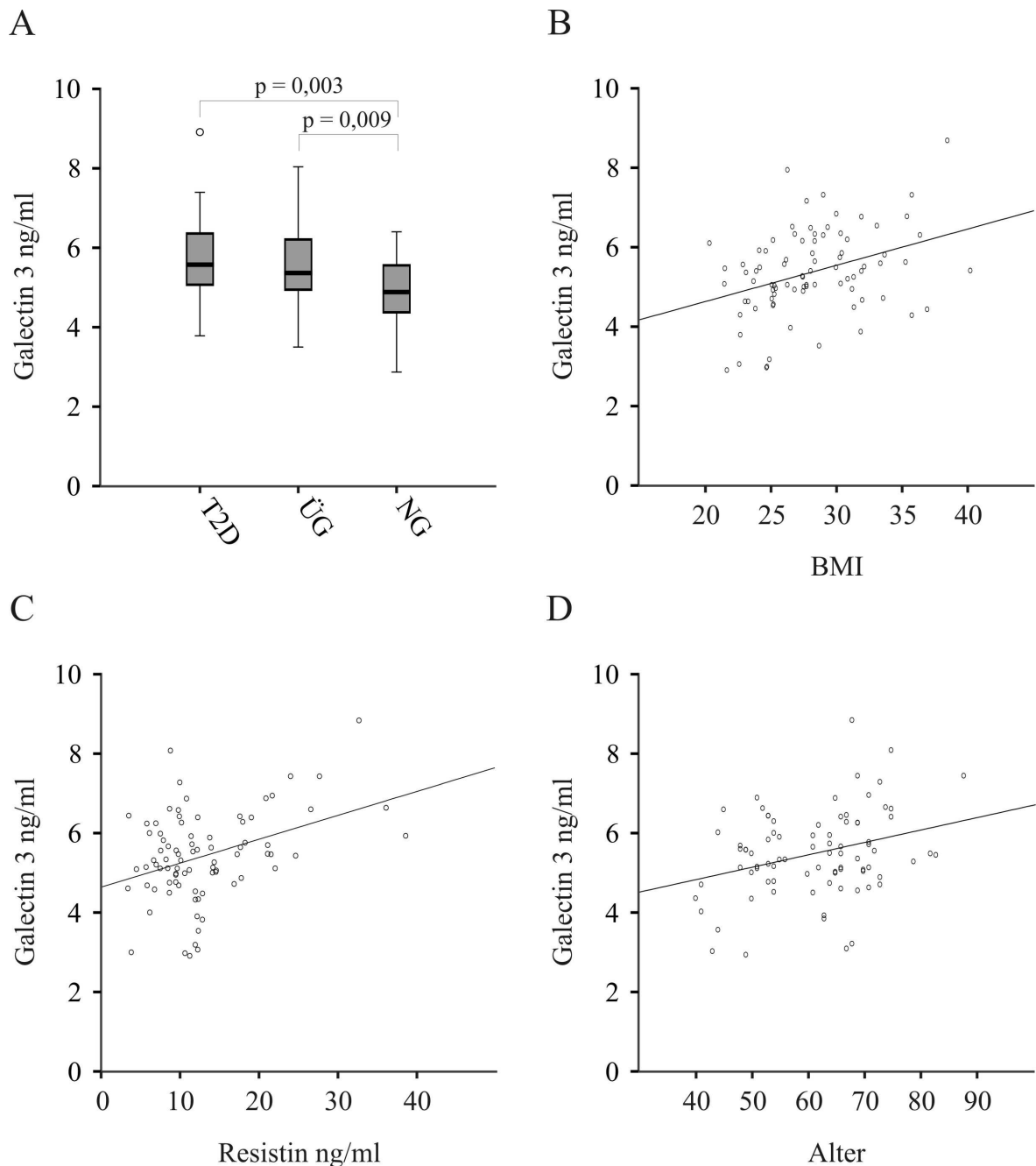


Abbildung 67: Bestimmung des systemischen Galectin 3 mittels ELISA im Serum der Probandengruppe 1 (Tab. 3) bestehend aus normalgewichtigen ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$) (NG), übergewichtigen ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) (ÜG) und Typ 2 diabetischen (T2D) Männern (A) und Korrelation der Galectin 3 Serumkonzentration mit dem BMI (B), dem Serum Resistin (C) und dem Alter (D) in diesem Kollektiv.

Die systemische Galectin 3 Konzentration in diesem Kollektiv zeigte eine positive Korrelation zu BMI (Abb. 67 B), Serum Resistin (Abb. 67C) und Alter (Abb. 67D) sowie WHR und Serum Leptin der Probanden (Tab. 3). Diese Korrelationen hatten jedoch nach Korrektur für BMI und WHR keinen Bestand (Tab. 3). Eine Korrelation des systemischen

Galectin 3 mit Serum Nüchtern glukose, *C-Reactive Protein* (CRP), LDL- und HDL-Cholesterin sowie systemischen Adiponektin (Tab. 3) lag nicht vor (nicht gezeigt).

Korrelation von Galectin 3 mit	Pearson Korrelation	p-Wert	Partielle Korrelation nach Korrektur für BMI und WHR	p-Wert
Leptin (ng/ml)	0,250	0,023	0,084	n.s.
Restistin (ng/ml)	0,377	<0,001	0,247	n.s.
Alter	0,308	0,005	0,276	n.s.
BMI	0,357	0,001		
WHR	0,318	0,003		

Tabelle 4: Pearson Korrelation des systemischen Galectin 3 mit Leptin, Resistin, Alter BMI und WHR und partielle Korrelation des systemischen Galectin 3 nach Korrektur für BMI und WHR mit Leptin, Resistin und Alter in der Probandengruppe 1.

Die Bestimmung von Galectin 3 mittels ELISA im Serum der Probandengruppe 2 bestehend aus 100 Frauen und Männern mit Typ 2 Diabetes zeigte keinen Unterschied in der Galectin 3 Konzentration zwischen Frauen und Männern (Tab. 5 und Abb. 68A). Ein Geschlechtsdimorphismus wie für andere Adipozytokine lag demnach nicht vor. Eine Korrelation der Galectin 3 Serumkonzentration in diesem Kollektiv mit Alter, BMI, Dauer der Diabeteserkrankung, CRP, LDL- und HDL-Cholesterin oder C-Peptid war nicht gegeben (Tab. 5). Jedoch zeigte sich eine negative Korrelation des Galectin 3 Serumspiegels mit dem HbA1c Wert der Probanden (Abb. 68B). Patienten der Probandengruppe 2 mit Bluthochdruck, Neuropathie, Retinopathie, Nephropathie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder koronarer Herzkrankheit wiesen keine veränderten Galectin 3 Serumspiegel auf (Tab. 6). Jedoch war die Serumkonzentration an Galectin 3 in Typ 2 Diabetikern mit einem CRP Wert > 5 mg/l signifikant höher im Vergleich zu Typ 2 Diabetikern mit einem CRP-Wert ≤ 5 mg/l, welches der Referenzwert des örtlichen Labors ist (Abb. 68C).

	Frauen	Männer	p-Wert
Anzahl	45	55	
Alter (Jahre)	67 (45-84)	61 (41-86)	
BMI (kg/m ²)	26,5 (12,5-48,8)	28,4 (16,8-43,9)	p<0,001
C-Peptid (ng/ml)	1,6 (0,1-9,2)	1,7 (0,2-5,6)	
HDL (mmol/l)	1,30 (0,38-2,49)	1,16 (0,31-2,17)	
LDL (mmol/l)	2,80 (2,07-4,61)	3,10 (2,07-7,02)	
Dauer des Diabetes (Jahre)	5 (0-35)	5 (0-30)	
HbA1c (%)	6,8 (5,5-12,8)	7,2 (4,8-13,4)	
CRP (mg/l)	3,2 (0-167)	3,7 (0-195)	
Medikamente			
ACEI	14	20	
ARB	8	3	
Betablocker	13	15	
Lipidsenker	11	15	
Metformin	17	21	
Sulfonylharnstoffe	11	15	
Glinide	3	2	
Glitazone	2		
Konventionelle Insulintherapie	8	9	
Intensivierte Insulintherapie	12	17	
Nitrate		1	
Adipozytokine			
Galectin 3 (ng/ml)	5,3 (2,1-15,3)	4,6 (2,1-15,2)	

Tabelle 5: Anthropometrische und metabolische Daten der Probandengruppe 2 bestehend aus Frauen und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus.
Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACEI), Angiotensin II Receptor Blocker (ARB), Body Mass Index (BMI), C-Reactive Protein (CRP), High-Density Lipoprotein (HDL), Low-Density Lipoprotein (LDL).

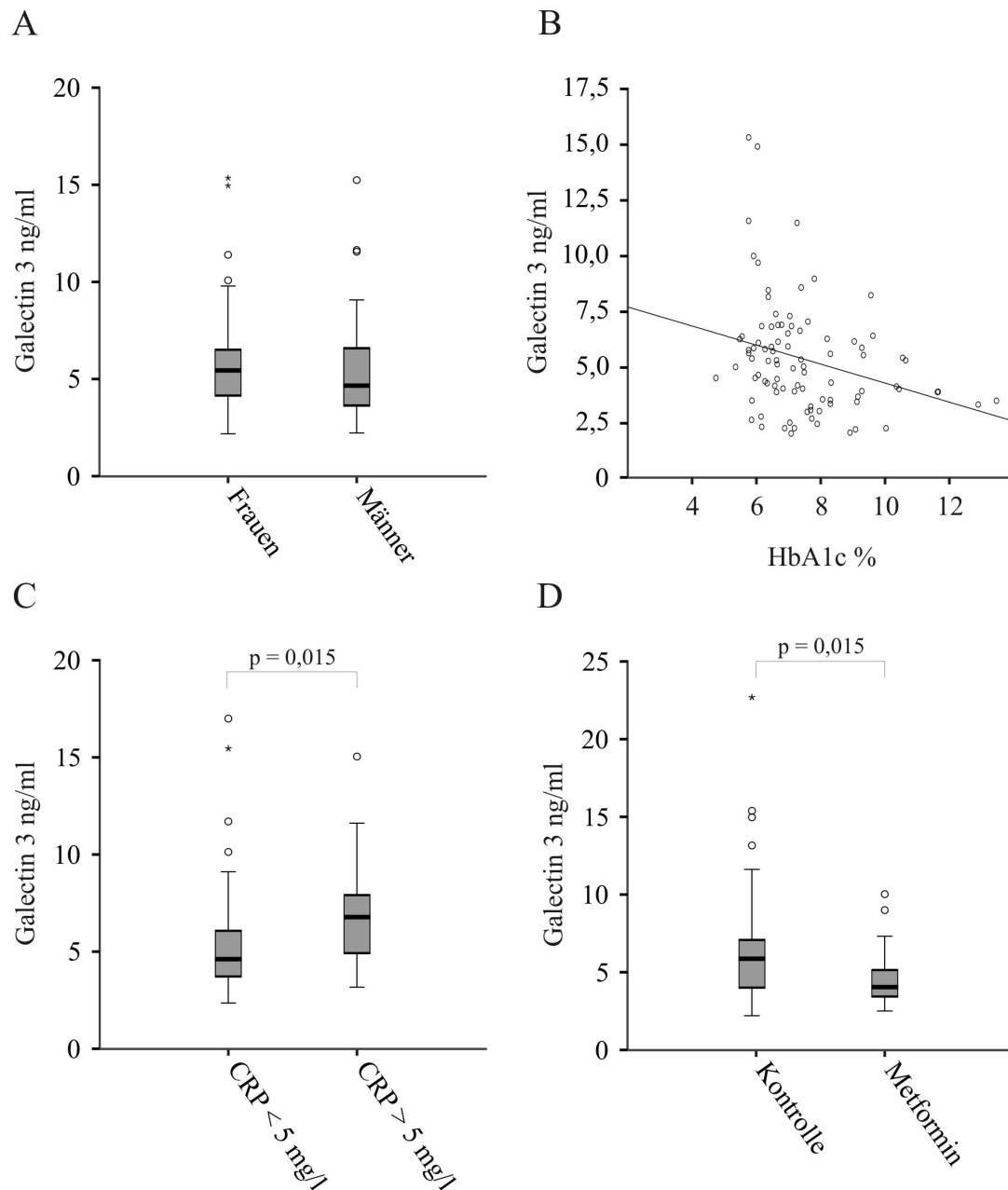


Abbildung 68: Bestimmung des systemischen Galectin 3 mittels ELISA im Serum der Probandengruppe 2 (Tab. 5) bestehend aus 100 Frauen und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus (A) und Korrelation der Galectin 3 Serumkonzentration in diesem Kollektiv mit dem HbA1c Wert (B). Galectin 3 Serumkonzentration in Typ 2 Diabetes mellitus Patienten dieses Kollektivs mit einem CRP-Wert \leq bzw. $>$ 5 mg/l (C). Galectin 3 Konzentration im Serum von Typ 2 Diabetes mellitus Patienten dieses Kollektivs mit ähnlichem Alter, BMI und CRP-Wert ohne und mit Behandlung mit Metformin (D).

Bei einer Untersuchung des Einflusses verschiedener Medikamente auf die Galectin 3 Serumkonzentration der Typ 2 Diabetes Patienten der Probandengruppe 2 war kein Zusammenhang mit der Behandlung mit Lipidsenkern, *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors* (ACEI), Sulfonylharnstoffen, Beta-Blockern oder einer intensivierten Insulintherapie zu erkennen. Für eine Aussage über den Einfluss einer Behandlung mit

Angiotensin II Receptor Blocker (ARB), Gliniden, Glitazone und einer konventionellen Insulintherapie lagen jeweils zu wenige Patienten vor (Tab. 5). Bei einem Vergleich von Patienten dieses Kollektivs mit oder ohne Behandlung mit Metformin, welche sich im Alter, BMI und CRP-Wert nicht signifikant unterschieden, zeigte sich eine signifikant niedrigere Galectin 3 Serumkonzentration in den 21 Patienten, welche Metformin einnahmen, im Vergleich zu den 34 Patienten, welche kein Metformin einnahmen (Abb. 68D). Dieses Ergebnis stimmt mit der in primären humanen Adipozyten gefundenen verringerten Galectin 3 Expression nach Stimulation mit Metformin überein (s. 3.5.2.1).

	mit	ohne	p-Wert
Bluthochdruck	79	21	n.s.
Neuropathie	28	70	n.s.
Nephropathie	26	74	n.s.
Retinopathie	14	86	n.s.
pAVK	12	88	n.s.
KHK	18	82	n.s.

Tabelle 6: Zahl der Typ 2 Diabetes mellitus Patienten mit Bluthochdruck, mikro- und markovaskulären Erkrankungen in der Probandengruppe 2. Es wurden keine signifikanten Unterschieden im systemischen Galectin 3 bei Patienten mit oder ohne den aufgeführten Komplikationen gemessen (nicht signifikant, n.s.). Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), koronare Herzkrankheit (KHK).

Für die Untersuchung des Beitrages des viszeralen Fettgewebes zur systemischen Galectin 3 Menge wurden portalvenöse, systemisch venöse und systemisch arterielle Serumproben von 2 Männern und 3 Frauen (Alter 64 (52-73) Jahre) analysiert, welche sich aufgrund nicht leberbedingter Erkrankungen, wie z.B. Metastasen extrahepatischer maligner Tumore, einer Operation an der Leber unterziehen mussten und normale Leberfunktionen aufwiesen. Die Bestimmung der Galectin 3 Serumkonzentration in den Proben dieser Probanden zeigte eine signifikant höhere Menge an Galectin 3 im portalvenösen Serum im Vergleich zum systemisch venösen Serum auf (Abb. 69). Die nachweisbare höhere Menge an Galectin 3 in der Pfortader spricht für einen bedeutsamen Beitrag des durch das viszerale Fettgewebe sezernierten Galectin 3 an dessen Gesamtserumkonzentration.

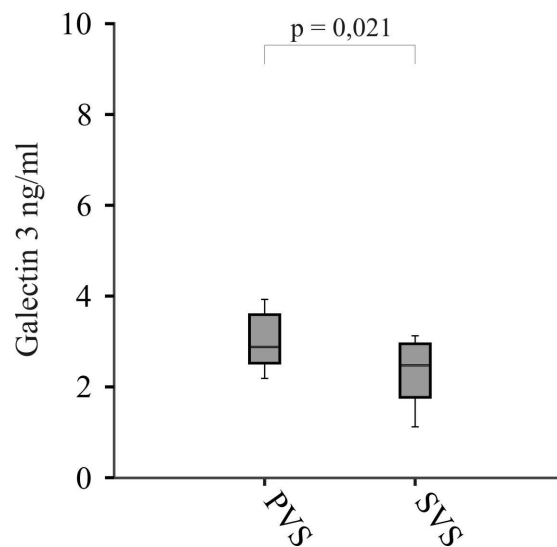


Abbildung 69: Bestimmung der Galectin 3 Menge mittels ELISA in portalvenösen (PVS) und systemisch venösen (SVS) Serum von zwei Männern und drei Frauen mit normaler Leberfunktion.

Im systemisch arteriellen Serum konnte kein signifikanter Unterschied der Galectin 3 Konzentration zum portalvenösen und systemisch venösen Serum gemessen werden (nicht gezeigt). Ein Ergebnis, welches eine erhöhte periphere Synthese oder Degradation nicht nahelegt.

3.5.4 Einfluss von Galectin 3 auf primäre humane Hepatozyten

Des Weiteren sollte der Einfluss von Galectin 3 als sezerniertes Protein des viszeralen Fettgewebes auf Hepatozyten analysiert werden. Hierfür wurden primäre humane Hepatozyten dreier Spender (s. 2.2.1.5.2) für 24 h ohne (Kontrolle, K) oder mit 10 ng/ml rekombinanten Galectin 3 (G) stimuliert, anschließend die RNA der Zellen gewonnen, in cDNA umgesetzt und zur Hybridisierung von Affymetrix Human Genome U133_Plus2.0 Arrays (Auftragsarbeit des Kompetenzzentrums für fluoreszente Bioanalytik in Regensburg) verwendet (s. 2.2.6). Insgesamt wurden 55.000 Gensonden untersucht. Eine Auswertung der untersuchten Gensonden lieferte mehrere Kandidatengene, deren Expression durch Galectin 3 induziert bzw. reprimiert war und von welchen einige in Tabelle 7 wiedergegeben sind. Die Effekte waren jedoch sehr gering. Eine Veränderung um den Faktor zwei wie bei Stimulation mit Omentin lag nicht vor (s. 3.4.5). Eine Verifizierung der Regulation der identifizierten Kandidatengene auf mRNA- und Proteinebene mittels Real-Time RT-PCR und Immunoblot muss noch erfolgen.

Abkürzung	K vs G (Sp1)	K vs G (Sp2)	K vs G (Sp3)	Genname
FABP4	0,5	0,6	0,7	Fatty Acid Binding Protein 4
FABP5	0,4	0,6	0,8	Fatty Acid Binding Protein 5
FABP3	0,8	0,8	0,7	Fatty Acid Binding Protein 3
FST	0,6	1,0	0,9	Follistatin
LGALS8	0,6	0,9	0,8	Galectin 8
LDLR	1,2	1,4	1,4	LDL Receptor
MMP14	1,3	1,4	1,5	Matrix Metalloproteinase 14
RDH13	1,4	1,2	1,4	Retinol Dehydrogenase 13
STAT1	1,4	3,2	1,7	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT2	1,5	1,5	1,1	Signal Transducer and Activator of Transcription 2
STAT3	1,5	1,1	1,2	Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Tabelle 7: Auflistung einiger Gene, deren Expression in der Genexpressionsanalyse von primären humanen Hepatozyten dreier Spender (Sp 1-3) mittels Affymetrix GeneChips® durch Stimulation mit 10 ng/ml rekombinanten humanen Galectin 3 (G) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (K) verändert waren.

3.6 Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1

Chemerin ist ein chemotaktisch wirkendes Protein, welches als Ligand für den G-Protein gekoppelten Rezeptor CMKLR1 dient, und spielt eine Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunantwort [168, 169, 171, 174, 175, 179, 242]. Chemerin kann als 18 kDA großes Protein im Serum nachgewiesen werden und wurde vor Kurzem als neues Adipozytokin identifiziert [165-167, 169, 171, 174, 181, 242]. Eine Expression von Chemerin wurde in verschiedenen Fettgewebsdepots des Menschen und der Maus detektiert, sowie eine Induktion in der Adipositas beobachtet [165-167, 181]. Chemerin und CMKLR1 werden von Adipozyten synthetisiert und Knock-down Experimente deuten auf eine Rolle von Chemerin und CMKLR1 in der Adipogenese und einen Einfluss von Chemerin auf die Insulinsignaltransduktion hin [165-167, 181-183]. Im Menschen korrelieren die Serumspiegel von Chemerin mit Markern des Metabolischen Syndroms wie BMI, Blutdruck, Insulinresistenz, HDL-Cholesterin, Triglyzeriden und Glukose und mit Entzündungsmakern wie IL-6 und TNF- α [165, 184, 185]. Mit seiner Rolle im Glukosestoffwechsel sowie in der angeborenen und erworbenen Immunantwort könnte Chemerin als neues Adipozytokin somit von Bedeutung für Metabolischen Syndrom sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression von Chemerin und CMKLR1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe und in Adipozyten untersucht werden, sowie die Serumkonzentration von Chemerin in der Adipositas und im Typ 2 Diabetes bestimmt und der Einfluss von Chemerin als Adipozytokin auf die Leber evaluiert werden.

3.6.1 Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im humanen Fettgewebe und in primären humanen Adipozyten

Ein immunchemischer Nachweis von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes war mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich. Eine mRNA Expression von Chemerin und CMKLR1 im subkutanen Fettgewebe zweier Spendern wurde 2007 von Goralski und Kollegen beschrieben [166]. Tan und Kollegen wiesen in einer jüngsten Veröffentlichung eine stärkere Expression von Chemerin auf mRNA- und Proteinebene im subkutanen und viszeralen Fettgewebe von Frauen mit polyzystischem Ovarsyndrom nach, ohne aber einen fettdepotspezifischen Expressionsunterschied erkennen zu können [181]. Die erfolgreiche Detektion von Chemerin Protein durch diese Arbeitsgruppe könnte auf die Verwendung

eines anderen evtl. sensitiveren Antikörpers bzw. auf eine unterschiedliche Probenvorbereitung zurückzuführen sein.

Des Weiteren zeigten Goralski und Kollegen eine höhere mRNA Expression von Chemerin und CMKLR1 in Adipozyten verglichen mit Präadipozyten, welche aus humanem subkutanem Fettgewebe isoliert wurden [166]. In einer Immunoblotanalyse der Proteinexpression von Chemerin und CMKLR1 Protein in Präadipozyten, welche aus subkutanen Fettgewebe isoliert wurden, und in den entsprechenden aus diesen Zellen in vitro differenzierten Adipozyten von zwei Spenderinnen konnte in den Adipozyten einer Spenderin eine höhere Expression von Chemerin und CMKLR1 detektiert werden (Abb. 70).

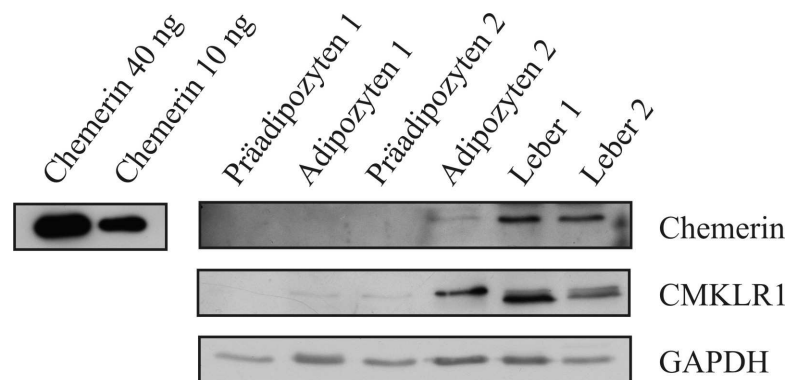


Abbildung 70: Nachweis von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 mittels Immunoblot in den subkutanen Präadipozyten und in vitro differenzierten Adipozyten zweier Spenderinnen sowie im Lebergewebe zweier weiterer Spender. Gleichzeitig erfolgte ein Nachweis von 40 und 10 ng rekombinanten humanen Chemerins. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Insgesamt war die Expression beider Proteine in den Präadipozyten und Adipozyten sehr gering verglichen mit ihrer Expression im Lebergewebe von zwei Spendern. Ein gleichzeitiger Nachweis von 40 und 10 ng rekombinanten humanen Chemerins zusammen mit diesen Proben bestätigte die Spezifität und Sensitivität des Antikörpers als auch die schwache Expression von Chemerin in den primären Adipozyten.

3.6.2 Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im Fettgewebe der Maus und in murinen 3T3-L1 Adipozyten

3.6.2.1 Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe der Maus

In den gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von vier C57BL/6 Mäusen ließ sich eine eindeutig stärkere Expression im viszeralen Fettdepot nachweisen (Abb. 71).

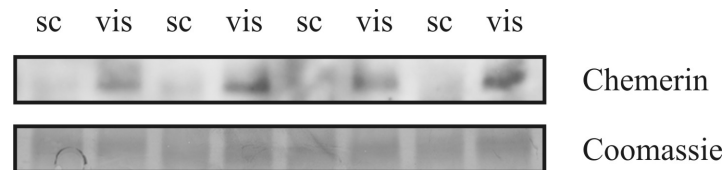


Abbildung 71: Analyse der Chemerin Proteinexpression in den gepaarten Proben subkutanen und viszeralen Fettgewebes von vier C57BL/6 Mäusen mittels Immunoblot. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran bestätigte die gleichmäßige Probenbeladung.

Bislang liegen keine Daten zur Expression von Chemerin Protein im Fettgewebe von Mäusen vor. In der Leptindefizienten ob/ob Maus wurde kein Unterschied der Chemerin und CMKLR1 mRNA Expression zwischen dem subkutanen und dem viszeralen Fettgewebe beschrieben, während eine Northern Blot Analyse eine höhere mRNA Expression von Chemerin im viszeralen Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen aufzeigte [166, 182].

3.6.2.2 Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten

3.6.2.2.1 Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten

Während der Differenzierung von murinen 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten konnte eine starke Induktion des Chemerinrezeptors CMKLR1 ausschließlich am Tag 1 der Differenzierung detektiert werden. Die Expression von Chemerin Protein nahm am Tag 6 der Differenzierung leicht zu um dann in den reifen 3T3-L1 Adipozyten sehr stark exprimiert zu werden (Abb. 72).

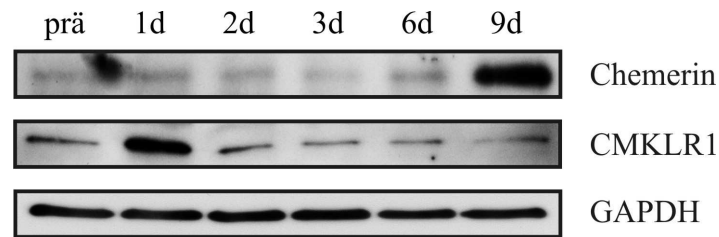


Abbildung 72: Bestimmung der Chemerin und CMKLR1 Proteinexpression mittels Western Blot in 3T3-L1 Präadipozyten (prä), in 3T3-L1 Zellen 1 (1d), 2 (2d), 3 (3d) bzw. 6 (6d) Tage nach Induktion der Adipozytendifferenzierung und in reifen 3T3-L1 Adipozyten (9d). GAPDH diente als Ladungskontrolle.

In der Literatur wird eine stetige Zunahme der mRNA Expression von Chemerin und CMKLR1 während der Adipogenese von 3T3-L1 Zellen mit der höchsten Expression in den reifen Adipozyten beschrieben [166, 167]. Daten zur Expression von Chemerin und CMKLR1 auf Proteinebene in 3T3-L1 Adipozyten liegen bislang nicht vor. Die abweichende starke Expression des CMKLR1 Proteins 24 h nach Induktion der Adipogenese könnte auf eine Regulation der Proteinexpression auf translationeller Ebene zurückzuführen sein.

3.6.2.2.2 Regulation der Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten

3.6.2.2.2.1 Einfluss von LPS auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten

Eine Stimulation von 3T3-L1 Zellen im Verlauf der Adipozytendifferenzierung mit 10 ng/ml LPS bewirkte eine starke Induktion des chemotaktisch wirkenden Chemerin Proteins in den reifen 3T3-L1 Adipozyten, welche immunchemisch mittels Western Blot detektiert werden konnte (Abb. 73).

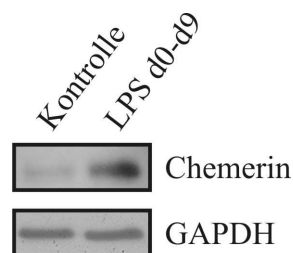


Abbildung 73: Immunoblotanalyse von Chemerin in 3T3-L1 Adipozyten, welche während der neuntägigen Differenzierung mit 10 ng/ml LPS stimuliert wurden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

3.6.2.2.2 Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten

Um den Einfluss von Glukose und Insulin auf die Expression von Chemerin und CMKLR1 zu untersuchen, wurden reife 3T3-L1 Zellen nach Abschluss der Differenzierung für drei Tage unter hyperglykämischen Bedingungen (HG, 25 mM Glukose) bzw. unter normoglykämischen Bedingungen (NG, 5 mM Glukose) kultiviert und anschließend für 24 h mit 0,2 bzw. 2 μ M Insulin stimuliert.

Basal zeigte sich unter hyperglykämischen Versuchsbedingungen eine etwas niedrigere Expression von Chemerin und eine etwas höhere Expression von CMKLR1 auf Proteinebene. Bei Stimulation mit Insulin zeigte sich bei Chemerin sowohl unter physiologischen Mengen von Glukose als auch unter hyperglykämischen Bedingungen eine Abnahme der Proteinexpression, während sich bei CMKLR1 unter den gleichen Versuchsbedingungen eine Zunahme der Proteinexpression nach Stimulation mit Insulin zeigte, die unter hyperglykämischen Bedingungen allerdings nur bei Einsatz der höheren Konzentration an Insulin zu erkennen war (Abb. 74).

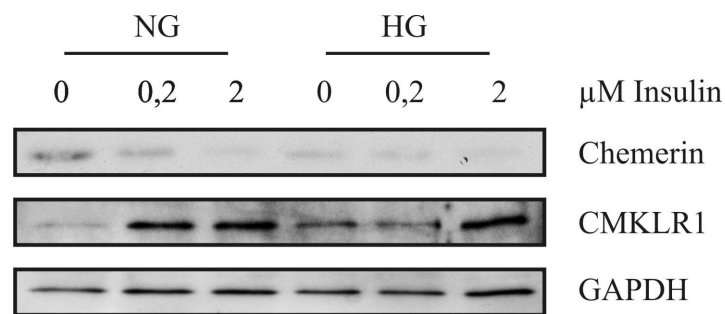


Abbildung 74: Immunoblotanalyse der Chemerin und CMKLR1 Proteinexpression in reifen 3T3-L1 Adipozyten nach dreitägiger Kultivierung unter normo- bzw. hyperglykämischen (NG bzw. HG) Bedingungen und anschließender Stimulation mit 0,2 und 2 μ M Insulin für 24 h. Der Nachweis der GAPDH Proteinexpression diente der Ladungskontrolle.

3.6.2.2.3 Einfluss von Fettsäuren auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten

Um einen möglichen Einfluss von freien Fettsäuren auf die Expression von Chemerin und CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten zu untersuchen, wurden 3T3-L1 Zellen in Anwesenheit von 200 bzw. 400 μ M Palmitinsäure, Ölsäure oder Linolsäure differenziert. Eine Analyse

der Proteinexpression in den reifen Adipozyten am Tag 9 mittels Immunoblot zeigte eine Induktion von Chemerin mit beiden verwendeten Konzentrationen Palmitinsäure (PA), einer gesättigten Fettsäure, sowie der einfach ungesättigten Ölsäure (OA) und der mehrfach ungesättigten Omega-6-Fettsäure Linolsäure (LA) (Abb. 75).

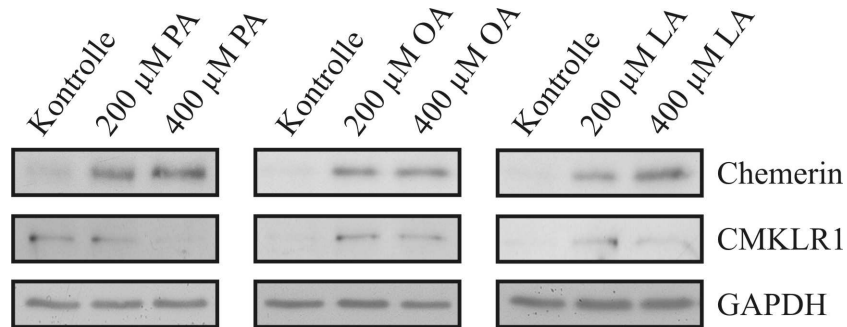


Abbildung 75: Analyse der Proteinexpression von Chemerin und CMKLR1 mittels Immunoblot in 3T3-L1 Zellen, welche während der Adipozytendifferenzierung mit Palmitinsäure (PA), Ölsäure (OA) bzw. Linolsäure (LA) (200 und 400 µM) behandelt wurden. Die Detektion von GAPDH in den Proben zeigte eine gleichmäßige Beladung des Blots.

Die Proteinexpression von CMKLR1 nahm nach Stimulation mit Ölsäure und Linolsäure ebenfalls mit beiden verwendeten Konzentrationen zu, während sie mit 200 µM Palmitinsäure unverändert war und 400 µM Palmitinsäure abnahm (Abb. 75).

3.6.2.2.4 Einfluss von Metformin, Fenofibrat und Pioglitazon auf die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten

Eine Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten für 24 h sowohl mit dem PPAR α Agonisten Fenofibrat in Konzentrationen von 10 und 50 µM also auch mit dem PPAR γ Agonisten Pioglitazon in Konzentrationen von 3,75, 7,5 und 12,5 µM oder mit dem AMPK Aktivator Metformin in Konzentrationen von 100 und 200µM hatte keinen Einfluss auf die Expression von Chemerin und CMKLR1 (nicht gezeigt).

3.6.3 Chemerin im humanen Serum

Chemerin wird vom Fettgewebe synthetisiert und sezerniert und lässt sich im Serum nachweisen [165-167, 181]. Während eine fettdepotspezifische Expression von Chemerin nicht beschrieben wurde, konnten mehrere Arbeitsgruppen eine höhere Expression im Fettgewebe in der Adipositas nachweisen [165, 166, 181]. Zu den Konzentrationen von Chemerin im humanen Serum liegen bereits Daten vor. Bozaoglu und Kollegen konnten im Serum von Typ 2 Diabetikern und glukosetoleranten Kontrollen keinen Unterschied im Chemerinspiegel nachweisen [165]. Stejskal und Kollegen hingegen identifizierten die Höhe des Chemerinspiegels als unabhängigen Marker für das Metabolische Syndrom, während Tan und Kollegen einen Zusammenhang zwischen Grad der Insulinresistenz und dem Serumchemerin fanden [181, 185]. Die Bestimmung von Chemerin in Serumproben von drei Probandengruppen sollte nun klären, ob systemisches Chemerin in der Adipositas erhöht ist und mit anderen Adipozytokinen und Entzündungsmarkern korreliert. Des weiteren sollte der Beitrag des viszeralen Fettgewebes am systemischen Chemerinspiegel analysiert werden.

Die Probandengruppe 1 setzte sich aus 30 normalgewichtigen ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$), 39 übergewichtigen ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) und 44 Typ 2 diabetischen Männern zusammen, deren anthropometrische und metabolische Daten in Tabelle 8 wiedergegeben sind (s. 2.2.8.1).

Die Bestimmung von Chemerin in den Serumproben der Probandengruppe 1 mittels ELISA zeigte, dass die Chemerin Serumkonzentration der Typ 2 Diabetiker ähnlich hoch war wie die der übergewichtigen Kontrollen, welches mit den Daten einer anderen Arbeitsgruppe übereinstimmt [165]. Im Vergleich mit der Serumkonzentration der normalgewichtigen Kontrollen war das systemische Chemerin in den Typ 2 Diabetikern und den übergewichtigen Kontrollen jedoch signifikant erhöht (Tab. 8 und Abb. 76A).

	T2D	ÜG	NG	p-Wert
Anzahl	44	39	30	
Alter (Jahre)	64 (42-88)	59 (41-79)	61 (40-73)	0,043 ¹
BMI (kg/m ²)	31,0 (21,2-45,9)	28,1 (25,9-36,5)	24,3 (20,0-24,9)	<0,001 ^{2,3}
WHR	1,05 (0,87-1,35)	1,01 (0,90-1,14)	0,94 (0,83-1,0)	0,012 ¹ , <0,001 ^{2,3}
Glukose (mmol/l)	7,16 (3,83-13,81)	4,66 (3,50-6,55)	4,72 (3,88-6,44)	<0,001 ^{1,3}
HDL (mmol/l)	1,06 (0,54-1,55)	1,40 (0,88-2,02)	1,37 (1,01-2,07)	<0,001 ^{1,3}
LDL (mmol/l)	3,99 (2,12-8,29)	5,02 (2,69-10,83)	4,76 (2,80-7,35)	0,008 ¹ , 0,02 ³
CRP (mg/l)	4,0 (0,2-42,6)	2,0 (0,3-29,0)	0,7 (0,2-40,1)	0,002 ² , <0,001 ³
Medikamente				
ACEI	15	9	2	
ARB	8			
Betablocker	19	3	1	
Diuretika	25	9	2	
Lipidsenker	18	11	4	
Insulin	14			
Urikostatika	12	1	1	
Metformin	20			
Sulfonylharnstoff	8			
Digitalis	10			
Adipozytokine				
Adiponektin (µg/ml)	2,8 (0,8-10,6)	3,0 (1,2-8,5)	2,4 (1,0-9,4)	
Leptin (ng/ml)	11,4 (3,0-82,9)	5,7 (1,6-26,5)	4,6 (1,2-14,6)	0,003 ¹ , 0,03 ² , <0,001 ³
Restistin (ng/ml)	14,6 (8,5-38,4)	10,0 (5,2-18,3)	8,8 (3,6-17,8)	<0,001 ^{1,3}
Chemerin (ng/ml)	144 (64-311)	119 (65-235)	94 (54-139)	0,002 ² , <0,001 ³

Tabelle 8: Anthropometrische und metabolische Daten der Probandengruppe 1 bestehend aus normalgewichtigen Männern (BMI \leq 25 kg/m², NG), übergewichtigen Männern (BMI > 25 kg/m², ÜG) und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2D).
p-Werte: ¹ T2D gegen ÜG, ² ÜG gegen NG, ³ T2D gegen NG.
Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACEI), Angiotensin II Receptor Blocker (ARB), Body Mass Index (BMI), C-Reactive Protein (CRP), High-Density Lipoprotein (HDL), Low-Density Lipoprotein (LDL).

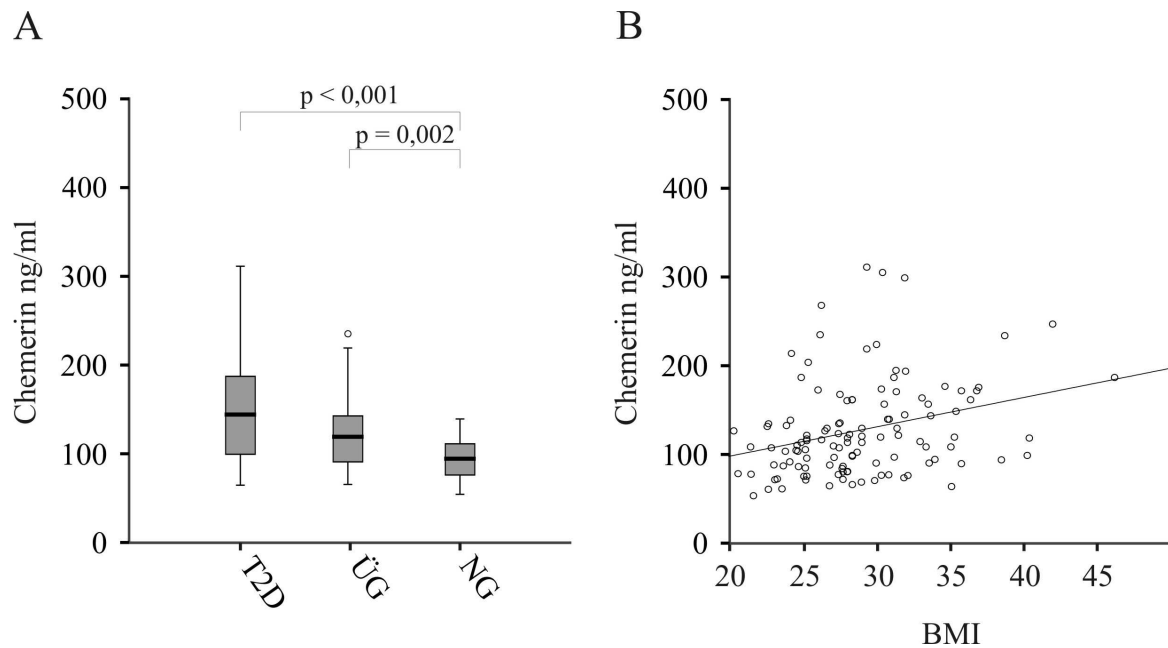


Abbildung 76: Bestimmung des systemischen Chemerin mittels ELISA im Serum der Probandengruppe 1 (Tab. 8) bestehend aus normalgewichtigen ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$) (NG), übergewichtigen ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) (ÜG) und Typ 2 diabetischen (T2D) Männern (A) und Korrelation der Chemerin Serumkonzentration mit dem BMI (B) in diesem Kollektiv.

Des Weiteren zeigte sich eine mäßige positive Korrelation des Serum Chemerin der Probanden mit deren BMI (Tab. 9 und Abb. 76B), WHR und CRP Spiegel (Tab. 9), sowie eine stark positive Korrelation zu deren systemischen Leptin- und Resistinspiegeln (Tab. 9). Zudem korrelierte die systemische Chemerin Konzentration negativ mit dem HDL-Cholesterin der Probanden (Tab. 9). Die Korrelationen von Chemerin mit Leptin, Resistin und HDL-Cholesterin waren auch nach Korrektur für BMI und WHR noch vorhanden. Eine Korrelation von Serum Chemerin mit Alter, Nüchternblutzucker, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyzeriden und systemischen Adiponektin lag nicht vor (nicht gezeigt).

Korrelation von Chemerin mit	Pearson Korrelation	p-Wert	Partielle Korrelation nach Korrektur für BMI und WHR	p-Wert
Leptin (ng/ml)	0,495	<0,001	0,428	<0,001
Restistin (ng/ml)	0,452	<0,001	0,508	<0,001
CRP	0,337	0,001	0,301	0,005
HDL	-0,325	0,001	-0,329	0,002
BMI	0,300	0,001		
WHR	0,270	0,004		

Tabelle 9: Pearson Korrelation des systemischen Chemerin mit Leptin, Resistin, CRP, HDL, BMI und WHR und partielle Korrelation des systemischen Chemerin nach Korrektur für BMI und WHR mit Leptin, Resistin, CRP und HDL in der Probandengruppe 1 bestehend aus normalgewichtigen Männern ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$, NG), übergewichtigen Männern ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$, ÜG) und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2D). (Nicht signifikant, n.s.).

Die Bestimmung des systemischen Chemerin in den Serumproben von 46 Frauen und 61 Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus der Probandengruppe 2 (anthropometrische und metabolische Daten s. Tab. 10) (s. 2.2.8.1) zeigte keinen geschlechtsspezifischen Unterschied der Chemerin Serumkonzentration (Tab.10 und Abb. 77A). Die Chemerin Serumspiegel dieser Probanden korrelierten nicht mit Alter, BMI, Dauer der Diabeteserkrankung, CRP, Leukozytenzahl, Triglyzeriden, LDL- und HDL- Cholesterin, Kreatinin, Kreatinin-Clearance, Harnstoff, Harnsäure und HbA1c (nicht gezeigt). Jedoch ließ sich eine positive Korrelation des systemischen Chemerin mit dem C-Peptidspiegel der Probanden nachweisen ($r = 0,383$, $p = 0,008$; nach Korrektur für BMI: $r = 0,345$, $p = 0,019$). Eine Veränderung des Serumspiegels von Chemerin in Patienten der Probandengruppe 2 mit Bluthochdruck, Neuropathie, Retinopathie, Nephropathie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder koronarer Herzkrankheit war nicht erkennbar (Tab. 11). Probanden mit einem CRP Wert $> 5 \text{ mg/l}$ hatten jedoch signifikant höhere systemische Chemerinwerte als Probanden einem CRP-Wert $\leq 5 \text{ mg/l}$, wobei dieser Wert dem Referenzwert des örtliche Labors für CRP entspricht (Abb. 77B).

	Frauen	Männer	p-Wert
Anzahl	46	61	
Alter (Jahre)	67 (45-84)	60 (39-86)	0,028
BMI (kg/m ²)	26,2 (12,5-48,8)	27,9 (16,8-43,9)	
C-Peptid (ng/ml)	1,6 (0,1-9,2)	1,8 (0,2-11,2)	
HDL (mmol/l)	1,29 (0,39-2,49)	1,17 (0,31-2,17)	p<0,001
LDL (mmol/l)	2,79 (2,07-4,61)	3,11 (2,07-7,02)	
Dauer des Diabetes (Jahre)	5 (0-35)	5 (0-30)	
HbA1c (%)	6,8 (5,5-12,8)	7,2 (4,3-13,4)	
CRP (mg/l)	4,2 (0-195)	3,8 (0-195)	
Medikamente			
ACEI	18	15	
ARB	3	7	
Betablocker	15	14	
Lipidsenker	13	11	
Metformin	21	16	
Sulfonylharnstoff	15	12	
Glinide	3	3	
Glitazone		2	
Alpha-Glukosidase Blocker	1	1	
Konventionelle Insulintherapie	9	9	
Intensivierte Insulintherapie	18	11	
Nitrate	2	1	
Adipozytokine			
Chemerin (ng/ml)	156 (33-425)	140 (43-312)	

Tabelle 10: Anthropometrische und metabolische Daten der Probandengruppe 2 bestehend aus Frauen und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus.
Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACEI), Angiotensin II Rezeptorblocker (ARB), Body Mass Index (BMI), C-Reactive Protein (CRP), High-Density Lipoprotein (HDL), Low-Density Lipoprotein (LDL).

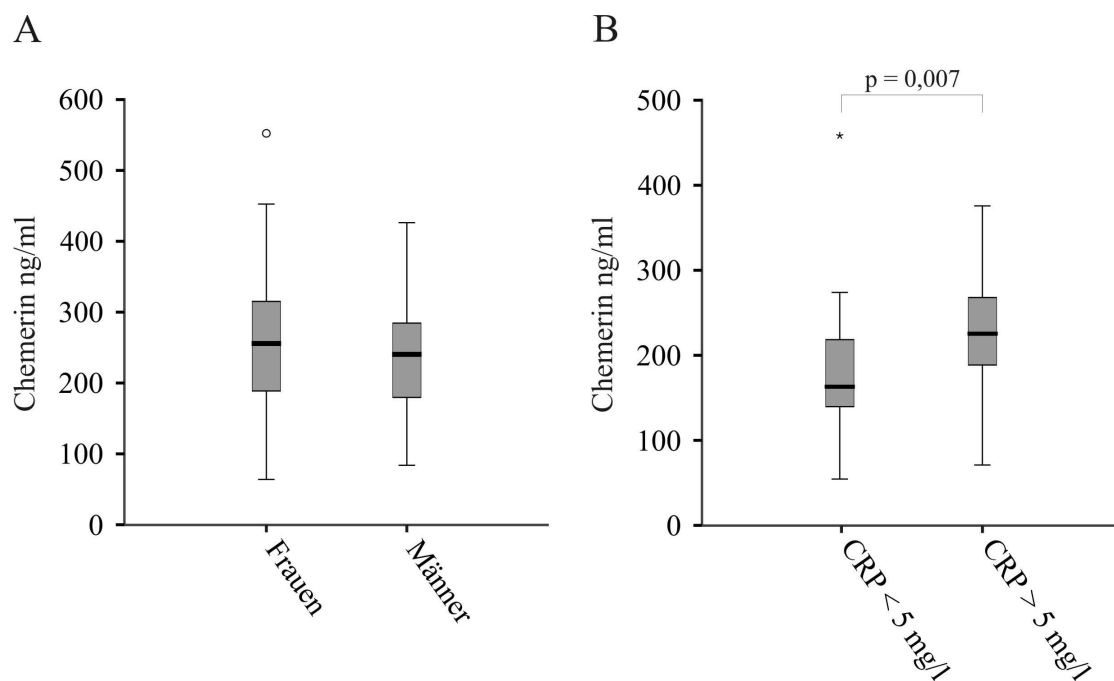


Abbildung 77: Bestimmung des systemischen Chemerin mittels ELISA im Serum der Probandengruppe 2 (Tab. 10) bestehend aus 107 Frauen und Männer mit Typ 2 Diabetes mellitus (A) und Chemerin Serumkonzentration in Typ 2 Diabetes mellitus Patienten dieses Kollektivs mit einem CRP-Wert \leq bzw. $>$ 5 mg/l (B).

	Frauen	Männer	Gesamt	p-Wert
Anzahl	46	61	107	
Bluthochdruck	35	43	78	n.s.
Neuropathie	19	8	27	n.s.
Nephropathie	17	9	26	n.s.
Retinopathie	8	5	13	n.s.
pAVK	6	5	11	n.s.
KHK	11	6	17	n.s.

Tabelle 11: Zahl der Patienten mit Bluthochdruck, mikro- und markovaskulären Erkrankungen in der Probandengruppe 2 bestehend aus Frauen und Männern mit Typ 2 Diabetes mellitus. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im systemischen Chemerin bei Patienten mit oder ohne den aufgeführten Komplikationen gemessen (nicht signifikant, n.s.). Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), koronare Herzkrankheit (KHK).

Ein Vergleich des Chemerin Serumspeiegels von 17 normalgewichtigen Typ 2 diabetischen Männern ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$) und 24 normalgewichtigen gesunden Männern der Probandengruppe 1 (Tab. 8) zeigte zudem, dass bei ähnlichem BMI der Probanden sowohl CRP ($p < 0,001$) als auch Chemerin ($p < 0,001$) im Serum der Typ 2 Diabetiker signifikant höher waren (Abb. 79).

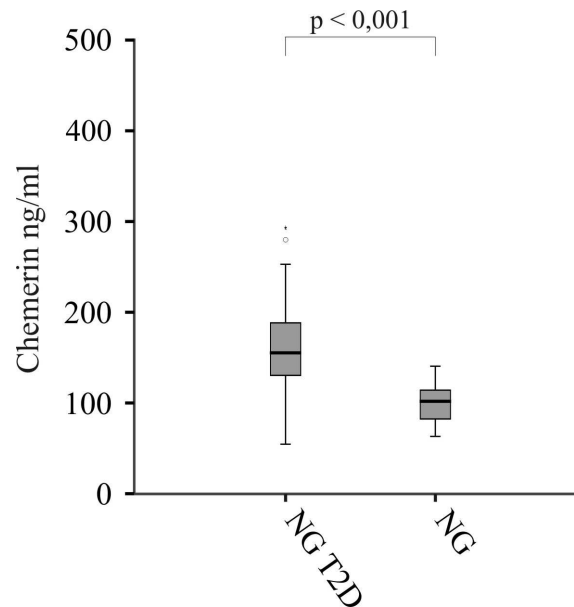


Abbildung 78: Bestimmung des systemischen Chemerin im Serum von normalgewichtigen Typ 2 diabetischen Männern ($\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$) und normalgewichtigen gesunden Männern der Probandengruppe 1 (Tab. 8).

Um den Beitrag des vom viszeralen Fettgewebe sezernierten Chemerins am systemischen Chemerin zu evaluieren, wurde in portalvenösen (PVS), hepatisch venösen (HVS) und systemisch venösen (SVS) Serum von Patienten, welchen in Folge einer Leberzirrhose ein transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt (TIPS) implantiert wurde bzw. welche sich aufgrund anderer nicht leberbedingter Erkrankungen einer Operation unterziehen mussten (Probandengruppe 3) (s. 2.2.8.1), die Menge an Chemerin mittels ELISA bestimmt.

Die Messung der Chemerinspiegel ergab in den Patienten mit einer Leberzirrhose eine ähnliche Konzentration von Chemerin im portalvenösen und systemischen Serum, jedoch war die Menge an Chemerin im hepatisch venösen Serum signifikant höher als im portalvenösen Serum (Abb. 79A).

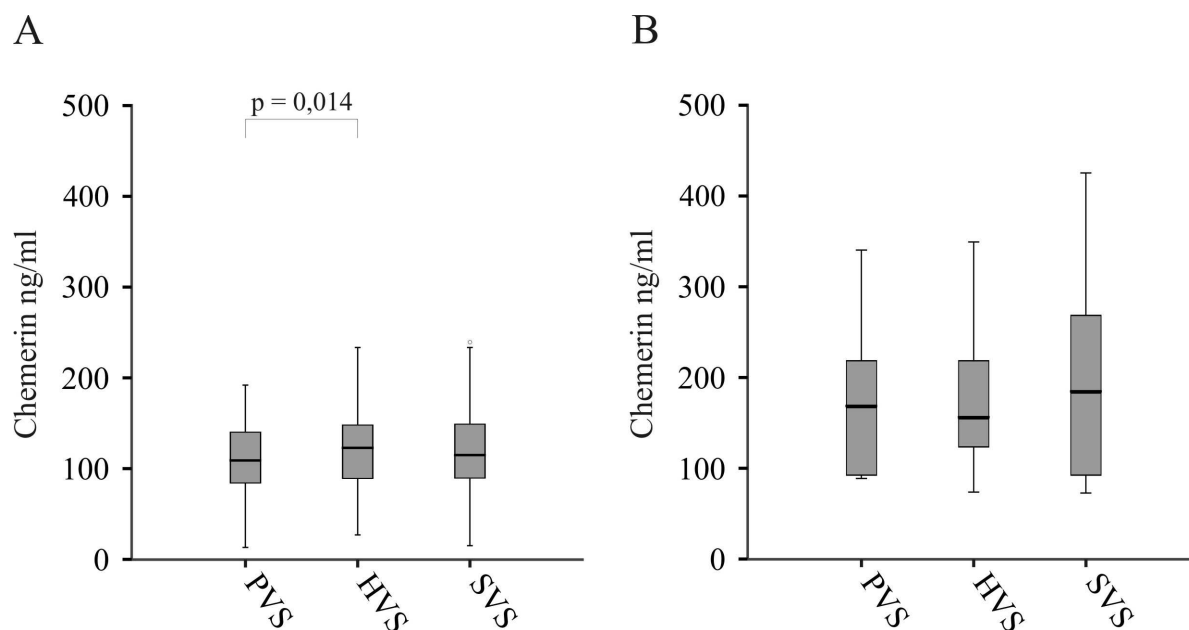


Abbildung 79: Bestimmung von Chemerin mittels ELISA in portalvenösen (PVS), hepatisch venösen (HVS) und systemisch venösen (SVS) Serum von Patienten mit Leberzirrhose (A) bzw. gesunden Kontrollen mit normaler Leberfunktion (B).

	Typ 2 Diabetiker	Kontrollen	p-Wert
Anzahl	9	35	
Alter (Jahre)	63 (45-36)	49 (40-76)	0,029
BMI (kg/m ²)	25 (19-36)	26 (17-38)	
HbA1c (%)	6,5 (4,9-9,8)	5,2 (3,9-6,2)	0,009
Quick-Wert (%)	80 (49-97)	71 (28-100)	
Albumin (g/l)	32,1 (3,6-40,0)	33,1 (1,6-47,0)	
Chemerin (ng/ml)			
PVS	111 (46-187)	106 (11-192)	
HVS	122 (66-185)	125 (25-234)	
SVS	127 (57-234)	114 (24-140)	

Tabelle 12: Patienten der Probandengruppe 3 bestehend aus Frauen und Männern mit Leberzirrhose, welche zusätzlich an einem Typ 2 Diabetes mellitus erkrankt waren bzw. keine Störung des Glukosestoffwechsels aufwiesen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Chemerinspiegel im portalvenösen (PVS), hepatisch venösen (HVS) und im systemischen (SVS) Serum in Abhängigkeit einer Diabeteserkrankung gemessen werden.

Von den Patienten mit Leberzirrhose der Probandengruppe 3 waren neun an Typ 2 Diabetes mellitus erkrankt (Tab. 12). Der Serumspiegel von Chemerin im PVS, HVS und SVS dieser Probanden wies jedoch keinen Unterschied im Vergleich zu den nicht an Typ 2 Diabetes mellitus erkrankten Patienten dieses Kollektivs auf (Tab. 12).

Die Chemerin Serumkonzentration der 6 gesunden Kontrollen lag im gleichen Bereich wie die Chemerin Konzentration im Serum der Leberzirrhotiker. Eine höhere Konzentration an Chemerin im HVS im Vergleich zum PVS und SVS konnte in der Kontrollgruppe im Gegensatz zu den an Leberzirrhose erkrankten Probanden nicht detektiert werden (Abb. 79B). Im systemisch arteriellen Serum der Kontrollpersonen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Chemerin Konzentration zum venösen Serum gemessen werden (nicht gezeigt). Demzufolge ist eine erhöhte periphere Synthese oder Degradation unwahrscheinlich.

3.6.4 Einfluss von Chemerin auf primäre humane Hepatozyten

Zudem sollte der Einfluss von Chemerin als sezerniertes Protein des viszeralen Fettgewebes auf Hepatozyten analysiert werden. Hierfür wurde die cDNA von primären humanen Hepatozyten dreier Spender (s. 2.2.1.5.2), welche für 24 h ohne (Kontrolle, K) oder mit 40 ng/ml rekombinanten Chemerin (C) stimuliert wurden, zur Hybridisierung von Affymetrix Human Genome U133_Plus2.0 Arrays (Auftragsarbeit des Kompetenzzentrums für fluoreszente Bioanalytik in Regensburg) eingesetzt (s. 2.2.6). Insgesamt wurden 55.000 Gensonden untersucht. Eine Auswertung der untersuchten Gensonden lieferte mehrere Kandidatengene, deren Expression durch Chemerin induziert bzw. reprimiert (Tab. 13). Eine Verifizierung der Regulation der identifizierten Kandidatengene auf mRNA- und Proteinebene mittels Real-Time RT-PCR und Immunoblot muss noch erfolgen.

Abkürzung	K vs C (Sp1)	K vs C (Sp2)	K vs C (Sp3)	Genname
CD36	0,6	1,0	0,8	CD 36 Antigen / Fatty Acid Translocase
COL8A2	1,1	1,2	1,3	Collagen Type VIII Alpha 2
CCNA2	0,8	0,7	0,9	Cyclin A2
IL6ST	0,6	0,9	0,8	Interleukin 6 Signal Transducer
RICTOR	0,5	0,8	0,9	Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR
SOCS4	0,4	0,8	0,8	Suppressor of Cytokine Signaling

Tabelle 13: Gene, deren Expression in der Genexpressionsanalyse von primären humanen Hepatozyten dreier Spender (Sp 1-3) mittels Affymetrix GeneChips® durch Stimulation mit 40 ng/ml rekombinanten humanen Chemerin (C) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (K) verändert waren.

4 Diskussion

4.1 Expression der untersuchten Proteine im Fettgewebe

Eine erhöhte Fettgewebssmasse geht mit einer leichtgradigen systemischen Entzündung einher. Im hypertrophen Fettgewebe werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*) gebildet, die sowohl die adipozytäre Insulinresistenz als auch die Freisetzung entzündlicher Mediatoren beeinflussen [47]. In der Adipositas ist insbesondere die Zunahme des viszeralen Fettgewebes mit einem erhöhten Risiko für Insulinresistenz und metabolischen Erkrankungen verbunden [3]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die depotspezifische Expression von AOX1, SOD2, Annexin A6, Omentin, Galectin 3, Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1 im subkutanen und viszeralen Fettgewebe sowie der Einfluss von Adipositas, Insulin und Glukose bzw. einer Insulinresistenz auf deren Expression untersucht.

AOX1 und SOD2 sind zwei der wichtigsten Enzyme für die Regulation zellulärer ROS. Galectin 3 und Chemerin regulieren die Funktion von Immunzellen und sind bei entzündlichen Erkrankungen erhöht. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich bekannt, dass beide Proteine vom Fettgewebe freigesetzt werden. Annexin A6 hingegen beeinflusst die Aufnahme und zelluläre Verteilung von Cholesterin. Da der Anteil an Cholesterin im Lipidtropfen bestimmt, wieviel Triglyzeride gespeichert werden können, wurde eine Funktion von Annexin A6 in Adipozyten postuliert. Omentin war bereits als ein vermehrt vom viszeralen Fettgewebe freigesetztes Adipokin beschrieben.

4.1.1 Depotspezifische Expression im subkutanen und viszeralen Fettgewebe

In den gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebssproben von zehn Spendern zeigte sich eine überwiegend viszerale Expression von Annexin A6, Omentin und Galectin 3, während SOD2 im subkutanen Fettgewebe stärker exprimiert war. Dieses Expressionsmuster war auch in den gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebssproben von C57BL/6 Mäusen zu erkennen, der Unterschied war allerdings im Vergleich zum humanen Fettgewebe weniger stark ausgeprägt. Für AOX1 konnte die in der Literatur beschriebene erhöhte Expression im viszeralen Fettgewebe auf mRNA Ebene bestätigt werden [105]. Auf Proteinebene war die Expression von AOX1 individuell sehr unterschiedlich und zeigte keine Präferenz für ein Fettgewebsdepot. Auch für die Expression in der Leber sind für AOX1 sehr große Unterschiede zwischen einzelnen

Individuen beschrieben worden [101]. Die Detektion einer fettdepotspezifischen Expression von Chemerin und CMKLR1 war in humanen Fettgewebeproben auf Grund der geringen Sensitivität der Antikörper nicht möglich. Von zwei Arbeitsgruppen wurde eine Expression beider Proteine im humanen Fettgewebe nachgewiesen, jedoch nicht unter dem Gesichtspunkt einer depotspezifische Expression untersucht [166, 181]. In den gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebeproben von C57BL/6 Mäusen ließ sich deutlich eine stärkere Expression von Chemerin im viszeralen Fettgewebe nachweisen. Obwohl dieses Ergebnis in humanen Proben mit einem anderen Antikörper bestätigt werden müsste, lässt sich aufgrund der übereinstimmenden Expression der anderen untersuchten Proteine im humanen und murinen System eine höhere Expression von Chemerin im viszeralen Fettgewebe vermuten. Unter dieser Annahme würden die in dieser Arbeit untersuchten Adipokine Omentin, Galectin 3 und Chemerin überwiegend vom viszeralen Fettgewebe sezerniert.

Zudem wurde die depotspezifische Expression weiterer Proteine im subkutanen und viszeralen humanen Fettgewebe untersucht. Adiponektin, Adipophilin, ApoE und Flotillin 1 wurden vermehrt im subkutanen Fettgewebe und PI3K und CD163 vermehrt im viszeralen Fettgewebe exprimiert. Das Expressionsmuster steht im Einklang mit der aktuellen Literatur. So ist die vermehrte Expression des insulinsensitivierenden Adipozytokins Adiponektin im subkutanen Fettgewebe bereits beschrieben [24, 243, 244]. Ebenso ist die niedrigere Expression von ApoE im viszeralen Fettgewebe bekannt [245, 246]. Die Expression von ApoE korreliert mit dem Differenzierungsgrad und der Größe der Adipozyten sowie deren Insulinsensitivität [247, 248]. Endogen in Adipozyten gebildetes ApoE vermittelt dort die Einlagerung von Triglyzeriden und Cholesterin in die Zelle [249]. Die höhere Expression von ApoE im subkutanen Fettgewebe deckt sich mit den signifikant höheren Mengen an Cholesterin, Triglyzeriden und Fettsäuren, welche in den subkutanen Fettgewebeproben nachgewiesen wurden. Dies steht im Einklang mit der höheren Lipolyserate des viszeralen Fettgewebes [47]. Für die an der Insulinsignaltransduktion beteiligte PI3K wurde in primären humanen Adipozyten kein Unterschied in der Proteinexpression in Abhängigkeit des zur Isolation verwendeten Fettdepots entdeckt [250]. Jedoch wurde in Genexpressionsanalysen eine erhöhte Expression im viszeralen Fettgewebe beschrieben [105]. Da sich das Fettgewebe neben Adipozyten aus verschiedenen anderen Zellen zusammensetzt, könnte die identifizierte höhere Expression im viszeralen Fettgewebe auch auf andere Zelltypen zurückzuführen sein. Die stärkere Expression des Monozyten- und Makrophagenspezifischen Oberflächenmarkers CD163 im

viszeralem Fettgewebe spiegelt die höhere Infiltration dieses Fettdepots mit Makrophagen wider, die sich in der Adipositas auf Grund des zunehmenden inflammatorischen Milieus nochmals erhöht [40, 251-253]. Für das ubiquitär exprimierte Lipidtropfen assoziierte Protein Adipophilin wurde noch keine fettdepotspezifische Expression beschrieben [254, 255]. Ebenso ist für Flotillin 1, einem Lipid Raft assoziierten Protein, das nach Stimulation mit Insulin die PI3K unabhängige Rekrutierung des Glukosetransporters GLUT4 an die Zytoplasmamembran vermittelt, eine höhere Expression im subkutanen Fettgewebe noch nicht bekannt [256, 257]. Flotillin 1 ist u.a. in Adipozyten exprimiert und ist in den Erythrozyten von Typ 2 Diabetikern reduziert [258].

4.1.2 Expression in der Adipositas und in der Insulinresistenz

In Hochfettratten, einem Tiermodell nahrungsbedingter Adipositas, nahm die mRNA Expression der AOX1 im viszeralem Fettgewebe der Tiere, welchen eine Hochfettdiät basierend auf Schweineschmalz (HF) bzw. Olivenöl (OF) gefüttert wurde, signifikant ab. Im viszeralem Fettgewebe von Tieren auf Kokosnussfett (KF) basierender Hochfettdiät war hingegen keine Regulation ersichtlich. Sowohl die HF als auch die OF Hochfettdiäten führten zu einer Insulinresistenz in den Tieren. Die gleiche Regulation fand sich in der Expression des für die Adipogenese essentiellen Transkriptionsfaktors PPAR γ , der im Fettgewebe der HF und OF Tiere signifikant vermindert war. Ebenso war die Menge der AOX1 mRNA im viszeralem Fettgewebe der insulinresistenten Zuckerratten (ZDF), einem Tiermodell für eine insulinunabhängige Form des Typ 2 Diabetes mellitus, stark reduziert im Vergleich zur Expression im viszeralem Fettgewebe der insulinsensitiven Kontrolltiere (ZDL). Wiederum zeigte die Expression von PPAR γ in den Fettgeweben der ZDF und ZDL Ratten die gleiche Regulation. Dies könnte auf eine Koregulation von AOX1 und PPAR γ in der Insulinresistenz hinweisen. Die Expression von PPAR γ im Fettgewebe nimmt in der Adipositas parallel mit der Hypertrophie der Adipozyten ab. Mit zunehmender Lipideinlagerung werden die Adipozyten zwar größer, sind aber weniger gut differenziert [5, 259]. Ebenso ergab sich in Assoziationsstudien ein Zusammenhang zwischen dem Pro12Ala Allel des PPAR γ Gens mit einer höheren bzw. dem Gln115Pro Allel mit einer niedrigeren Insulinsensitivität im Menschen [238, 260]. In vitro zeigte die Expression von AOX1 Protein unter hyperglykämischen Bedingungen zudem eine verminderte Induktion nach Stimulation mit Insulin, während Fettsäuren keinen Einfluss auf die Expression hatten. Diese Ergebnisse sowie die gestörte Differenzierung von Adipozyten nach einem Knock-

down von AOX1 in den Präadipozyten sprechen für eine protektive Rolle der AOX1 im Fettgewebe.

Für Omentin, SOD2 und Annexin A6 konnte eine höhere Expression im viszeralen Fettgewebe der adipösen HF Ratten nachgewiesen werden. Bei Annexin A6 zeigte sich zudem im Fettgewebe der insulinresistenten ZDF Zuckerratten ein Verlust des fettdepotspezifischen Expressionsmusters. Während die insulin sensitiven ZDL Zuckerratten, wie auch schon im humanen und murinen Fettgewebe nachgewiesen, eine höhere Expression von Annexin A6 im viszeralen Fettgewebe aufwiesen, zeigten die insulinresistenten ZDF Ratten bedingt durch eine starke Induktion der Annexin A6 Expression im subkutanen Fettgewebe eine vergleichbare Menge an Annexin A6 Protein in beiden Fettgewebsdepots. Ob diese Veränderung im Expressionsmuster auf die Zunahme des Fettgewebes an sich in der Adipositas oder auf die Insulinresistenz im Besonderen zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen. In Adipozyten hatten erhöhte Mengen an Glukose keinen Einfluss auf die basale Expression von Annexin A6, ebenso wie eine Stimulation von reifen Adipozyten mit Insulin unter normo- bzw. hyperglykämischen Bedingungen oder eine Differenzierung von Adipozyten in Gegenwart von Fettsäuren nicht zu einer Veränderung der Annexin A6 Expression führten.

Die erhöhte Expression von SOD2 im viszeralen Fettgewebe der HF, KF und OF Ratten könnte hingegen auf deren Induktion durch ROS zurückzuführen sein. Freie Fettsäuren und Hyperglykämie in der Adipositas sind mit einer erhöhten Produktion von ROS in Folge der gesteigerten Aktivität der Atmungskette in den Mitochondrien verbunden [261]. Die Stimulation von Adipozyten mit Fettsäuren oder LPS führt zu einer Insulinresistenz und ist neben einer erhöhten Expression von IL-6 und einer Aktivierung von NFκB und AP-1 auch mit einer Anreicherung von ROS verbunden [236]. Übereinstimmend mit der Induktion von oxidativen Stress nimmt die Expression von SOD2 als mitochondriales ROS abbauendes Enzym kompensatorisch in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren dosisabhängig wie auch nach Stimulation mit LPS zu (Abbildung 81). Andere Enzyme dürften im Abbau von ROS eher eine untergeordnete Rolle spielen, da eine SOD2 Defizienz in Mäusen nicht kompensiert werden kann und perinatal zum Tod führt [108]. Die Kultivierung von Adipozyten unter hyperglykämischen Bedingungen hatte hingegen ebenso wie die Stimulation mit Insulin keinen Effekt auf die Expression von SOD2. Daher dürften die erhöhten Mengen an Fettsäuren und nicht die erhöhten Glukose- und Insulinspiegel in der Adipositas entscheidend für die Zunahme der SOD2 Expression im Fettgewebe sein. Dafür spricht auch, dass SOD2 im Fettgewebe der

KF Ratten ebenso induziert war wie im Fettgewebe der HF und OF Ratten, obwohl die mit Kokosnussfett gefütterten Tiere eine fast normale Insulinsensitivität aufwiesen im Gegensatz zu den insulinresistenten mit Schweineschmalz oder Olivenöl gefütterten Tiere (Abbildung 81) [210].

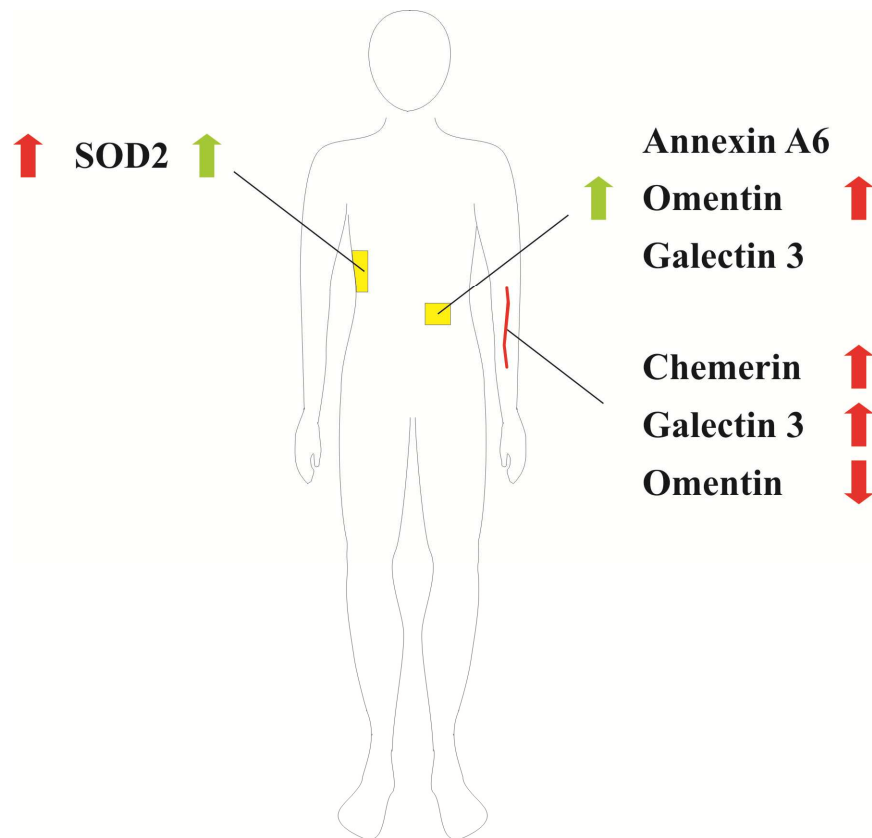


Abbildung 80: Schematische Darstellung der depot-spezifischen Expression (grüne Pfeile) der in dieser Arbeit untersuchten Proteine und deren Veränderung in der Adipositas (rote Pfeile). SOD2 wird stärker im subkutanen, Annexin A6, Omentin und Galectin 3 im viszeralen Fettgewebe exprimiert. In der Adipositas ist die Expression dieser Proteine erhöht. Die Serumkonzentration von Chemerin und Galectin3 ist in der Adipositas ebenfalls erhöht, die von Omentin erniedrigt.

4.2 Regulation der untersuchten Proteine in der Adipogenese

Im Fettgewebe von übergewichtigen und vor allem adipösen Menschen und Tieren ist die Adipogenese gestört. Die Speicherung von Lipiden ist vermindert und das Sekretionsmuster der Adipozytokine verändert sich. Diese Faktoren begünstigen die Entstehung einer Insulinresistenz [45, 51]. Eine Analyse der Regulation der untersuchten Proteine in der Adipogenese sollte daher neue Erkenntnisse über die Adipozytendifferenzierung an sich als auch über die Störung der Adipogenese liefern.

In der Adipogenese wird AOX1 früh induziert. Der AOX1 Promoter enthält Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren *Specificity Protein 1* und 3 (Sp1 und Sp3), welche bereits früh in der Adipozytendifferenzierung aktiviert werden [262, 263]. Die Expression von AOX1 nimmt wie die von PPAR α bereits am Tag 1 und Tag 2 der 3T3-L1 Adipozytendifferenzierung zu, während die Expression des intermediären Differenzierungsmarkers PPAR γ erst am Tag 3 der Differenzierung ansteigt und am Tag 6 weiter zunimmt [264]. Eine Reduktion der AOX1 Expression mit siRNA führt dementsprechend auch nur bei Behandlung der 3T3-L1 Zellen in der frühen Phase der Differenzierung am Tag 0 und Tag 3 zu einer verminderten Differenzierung der Adipozyten, wie sie durch die geringere Zahl und Größe von Lipidtropfen sowie einer reduzierten Speicherung von Triglyzeriden und einer verringerten Freisetzung von Adiponektin messbar war, während eine Reduktion am Tag 6 keinen Einfluss auf die Adipogenese hatte (Abbildung 82). AOX1 könnte z.B. an der Produktion von ROS oder Retinsäure beteiligt sein, welche beide in geringen Konzentrationen die Adipogenese fördern [112, 265, 266]. Des Weiteren könnte AOX1 durch Abbau von Aldehyden, die bei der Lipidperoxidation entstehen und die Adipogenese inhibieren, seinen förderlichen Einfluss geltend machen [267, 268].

Die Expression der SOD2 wurde unmittelbar nach Induktion der Adipogenese stark induziert und nahm im Verlauf der Adipogenese kontinuierlich zu, um in den reifen Adipozyten das höchste Expressionsniveau zu erreichen. Ein Knock-down der SOD2 in Präadipozyten beeinträchtigte die Adipogenese (Abbildung 82). Die Zellen waren nicht voll ausdifferenziert, wie an Hand der niedrigeren Expression von PPAR γ , der verringerten Zahl an Lipidtropfen, der verminderten Speicherung von Triglyzeriden und der reduzierten Freisetzung von Adiponektin festgestellt werden konnte. SOD2 würde somit durch Schutz vor oxidativen Schäden eine protektive Rolle in Adipozyten, u.a. auch in der Adipositas, einnehmen, da eine inadäquat niedrige SOD2 Expression höhere ROS Mengen nach sich zieht, welche die antioxidative Kapazität der Zellen übersteigen und zu einer reduzierten Speicherung von Lipiden und einer verminderten Freisetzung von Adiponektin führen. Die Insulin abhängige Aktivierung von AKT und ERK1/2 war jedoch nicht herabgesetzt. Demnach wird die Insulin abhängige Reprimierung der Lipolyse und die Insulin abhängige Speicherung von Lipiden durch die geringere SOD2 Expression nicht beeinflusst. Eine verminderte Menge an SOD2 Protein könnte folglich die Adipogenese stören, ohne die Insulinsensitivität zu beeinträchtigen.

Bei Untersuchung der Annexin A6 Expression in Adipozyten zeigte sich im Vergleich zu AOX1 und SOD2 nur eine verhältnismäßig geringe Zunahme des Proteins während der Differenzierung. Eine Überexpression von Annexin A6 während der Adipogenese führte zu Adipozyten mit einem spezifischen Phänotyp, der durch eine verminderte Speicherung von Triglyzeriden, einer geringeren Freisetzung von Adiponektin sowie weniger und kleineren Lipidtropfen gekennzeichnet war (Abbildung 82). Diese Lipidtropfen waren ringförmig am Zellrand angeordnet. Größe und Verteilungsmuster der Lipidtropfen änderten sich auch bei Differenzierung der Annexin A6 überexprimierenden Zellen in Gegenwart von Fettsäuren nicht wesentlich. Während in den Kontrollzellen überwiegend Lipidtropfen einheitlicher Größe zu finden waren, die sich über das gesamte Zellvolumen verteilten, waren in den Annexin A6 überexprimierenden Zellen weiterhin überwiegend kleinere randständige Lipidtropfen zu sehen, die vereinzelt durch einen großen zentral angeordneten Lipidtropfen durchbrochen wurden. Die höhere Expression von Annexin A6 in Adipozyten ist demnach mit einer geringeren Speicherkapazität für Lipide verbunden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem im subkutanen Fettgewebe von adipösen insulinresistenten ZDF Ratten beobachteten Anstieg der Annexin A6 Expression. Das subkutane Fettgewebe ist in der Adipositas durch hypertrophe Adipozyten mit einer verminderten Aufnahme von Lipiden charakterisiert und die Wirkung von Glitazonen setzt an diesem Ungleichgewicht an [86-88]. In Adipozyten war die Expression von Annexin A6 durch Pioglitazon jedoch nicht beeinflusst. Eine Rolle von Annexin A6 im Lipidstoffwechsel und in der Regulation der Lipidtropfen liegt nicht nur auf Grund des nachgewiesenen Phänotyps sondern auch auf Grund der vorhandenen Literatur nahe. So wurde in kleinen Adipozyten im Vergleich zu großen Adipozyten bei gleichzeitigem Vorliegen einer Insulinrezeptordefizienz eine verringerte Expression von Annexin A6 beobachtet. Neben Annexin A6 war in diesen Zellen eine Reihe von Proteinen und Enzymen mit einer Rolle im Lipidstoffwechsel herabreguliert [118]. Zudem wurde für Annexin A6 eine Rolle in der LDL Aufnahme und im intrazellulären Cholesterintransport beschrieben [119]. Eine vermehrte Expression von Annexin A6 geht mit einer Anreicherung von Caveolin 1 im Golgi Komplex sowie einer verminderten Zahl von Caveolae an der Plasmamembran einher [119]. Caveolin 1 ist der Hauptbestandteil von Caveolae, wird in der Adipogenese stark induziert und wurde vor kurzem an der Oberfläche von Lipidtropfen nachgewiesen [269]. Ausgehend von diesen neuen Daten wird vermutet, dass Lipidtropfen nicht nur durch Synthese und Speicherung von Triglyzeriden am Endosomalen Retikulum gebildet werden können, sondern auch durch eine Synthese von

Triglyzeriden aus Fettsäuren in Caveolae an der Zytoplasmamembran entstehen können [269]. Annexin A6 könnte diesen Caveolin 1 vermittelten Schritt der Lipidtropfengenesese durch Retention von Caveolin 1 im Golgi Komplex unterbinden.

Eine Untersuchung der Expression von Galectin 3 in der Adipogenese führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während in murinen 3T3-L1 Zellen die Expression von Galectin 3 in Präadipozyten sehr stark war und unmittelbar nach Induktion der Adipogenese abnahm, war in primären humanen Präadipozyten Galectin 3 nur schwach exprimiert, aber in den reifen Adipozyten stark induziert. Ob es sich hierbei um einen speziesspezifischen Effekt oder um eine Auswirkung der unterschiedlichen Kultivierungsmethoden handelt, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. LPS und Fettsäuren sind als proinflammatorische Stimuli, die auch in der Adipositas und im Typ 2 Diabetes mellitus erhöht vorliegen, in der Lage die Expression von Galectin 3 stark zu induzieren (Abbildung 81). Die Zunahme von Galectin 3 in Adipozyten war im Falle der Stimulation mit Fettsäuren dosisabhängig. Erhöhte Mengen Glukose hatten hingegen keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Galectin 3 Expression, jedoch war die Insulinabhängige Induktion von Galectin 3 unter diesen Bedingungen vermindert. Des Weiteren zeigten Adipozyten, in welchen vor Induktion der Adipogenese die Expression von Galectin3 durch Behandlung mit siRNA reduziert wurde, einen geringeren Differenzierungsgrad (Abbildung 82). Die Zellen bildeten weniger Lipidtropfen aus, speicherten weniger Triglyzeride ein und setzten geringere Mengen Adiponektin frei. Die Sensitivität der Zellen gegenüber Insulin war jedoch nicht beeinträchtigt. Die verminderte Expression von Galectin 3 war in diesen Zellen mit einer geringeren Menge FABP4 Protein verbunden, einem zytoplasmatischen Protein mit einer Rolle in der Aufnahme, dem Transport und der Verstoffwechselung von Fettsäuren in Adipozyten [270]. Die Überexpression von Annexin A6 in Adipozyten führte hingegen zu einer erhöhten Expression von Galectin 3 und auch von FABP4. Inwieweit diese beobachtete koordinierte Expression der beiden Proteine auf eine Koregulation bzw. auf eine Induktion von FABP4 durch Galectin 3 zurückzuführen ist, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Auch ob die beobachteten Effekte des Galectin 3 Knock-downs auf die reduzierte Menge intrazellulären Galectin 3 zurückzuführen sind oder auf eine daraus resultierende verminderte Menge extrazellulären Galectin 3 war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr festzustellen. Interessanterweise wurde aber vor Kurzem für Galectin 3 defiziente Mäuse eine geringere Diabetesprädisposition nach Streptozotocingabe gezeigt [152]. Die protektive Wirkung einer FABP4 Defizienz auf die Entwicklung von Adipositas,

Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes mellitus, Fettleber und Atherosklerose wurde hingegen schon vor einigen Jahren im Tiermodell nachgewiesen und könnte zu den beschriebenen Effekte der Galectin 3 Defizienz beitragen [270-272]. Im Gegensatz zu diesen bekannten Daten bewirkte Galectin 3 in humanen Leberzellen zudem eine Reduktion von FABP4, was zum einen zu einer verminderten Aufnahme von Lipiden und einer verbesserten Insulinsensitivität in der Leber führen könnte und zum anderen für eine Regulation von FABP4 durch Galectin 3 spricht.

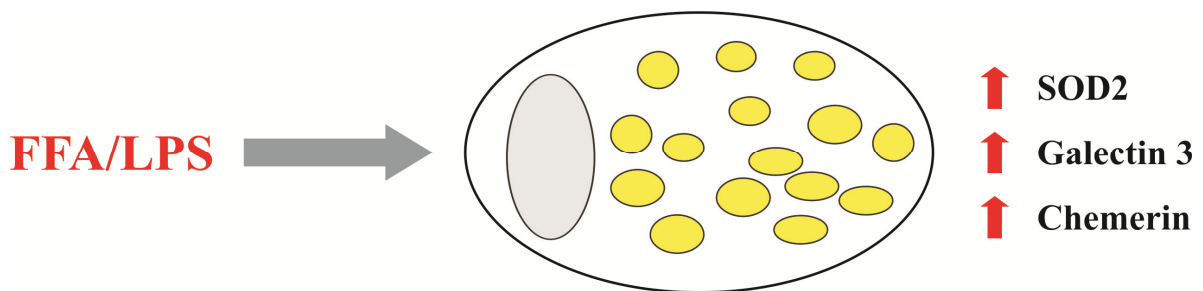


Abbildung 81: Schematische Darstellung der Wirkung von Fettsäuren (FFA, *Free Fatty Acid*) bzw. LPS auf die Expression von SOD2, Galectin 3 und Chemerin in Adipozyten.

Während die Expression von Chemerin und Chemerinrezeptor CMKLR1, übereinstimmend mit der Literatur, in reifen humanen Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten induziert war, wick die Expression von CMKLR1 in 3T3-L1 Adipozyten davon ab [166]. In 3T3-L1 Zellen wurde Chemerin am Tag 9 der Differenzierung in reifen Adipozyten stark induziert. CMKLR1 hingegen wurde ausschließlich am Tag 1 unmittelbar nach Induktion der Differenzierung in den 3T3-L1 Zellen vermehrt exprimiert, was für eine Rolle in der frühen Phase der Adipogenese spricht (Abbildung 82). Dies stimmt mit Ergebnissen von Goralski und Kollegen überein, die eine Inhibierung der Adipogenese nur bei einem Knock-down von Chemerin bzw. CMKLR1 in Präadipozyten fanden, nicht jedoch in Zellen die sich bereits in der Differenzierung befanden [166]. Des Weiteren wurde Chemerin in Adipozyten nach Stimulation mit Fettsäuren stark induziert. Die CMKLR1 Expression wurde durch Ölsäure und Linolsäure induziert, aber nicht durch Palmitinsäure. Die Expression des Chemoattraktant Chemerin nahm zudem nach Stimulation mit LPS zu (Abbildung 81). Sowohl zirkulierende Mengen von Fettsäuren als auch von Endotoxin sind in der Adipositas erhöht [273, 274]. Die Induktion von Chemerin durch Fettsäuren und LPS könnte die höheren Serumkonzentrationen in der Adipositas erklären. Hyperglykämische Bedingungen führten zu einer leichten Abnahme der Chemerin und einer leichten Zunahme

der CMKLR1 Expression in 3T3-L1 Adipozyten. Eine Stimulation mit Insulin unter hyper- als auch normoglykämischen Bedingungen resultierte in einer Reduktion von Chemerin und einer Induktion von CMKLR1. Ob die Reduktion des intrazellulären Chemerin mit einer erhöhten Menge extrazellulären Chemerins einhergeht und so unter hyperglykämischen hyperinsulinämischen Bedingungen, wie sie im Diabetes zu finden sind, zu einer vermehrten Rekrutierung von Makrophagen und so zu einer Zunahme der systemischen Entzündung führen könnte, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

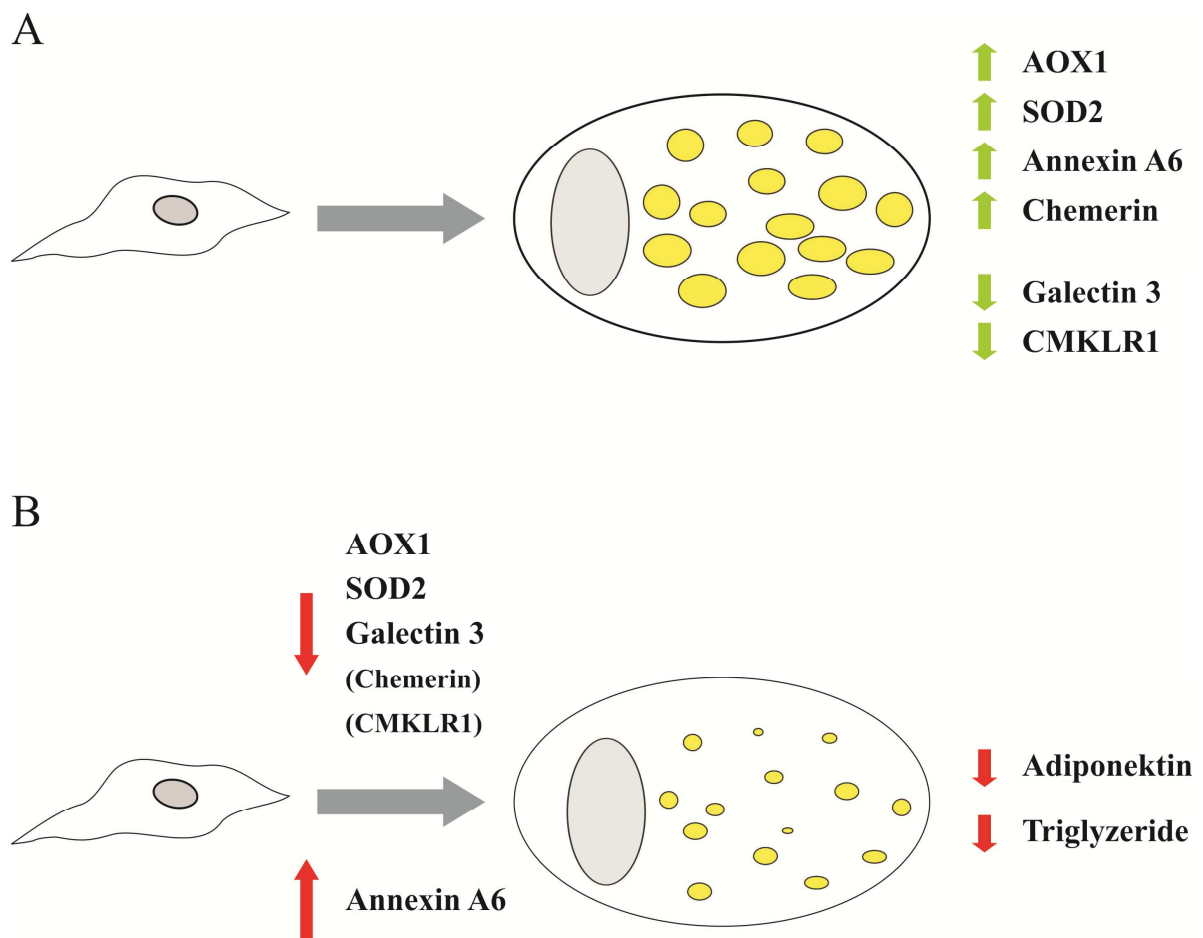


Abbildung 82: Schematische Darstellung der Zu- bzw. Abnahme Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine in der Adipogenese (rechts) im Vergleich zur Expression in Präadipozyten (links) (A). in der Adipositas und deren Effekte. Schematische Darstellung der gestörten Adipozytendifferenzierung bei Überexpression von Annexin A6 bzw. Knock-down von AOX1, SOD2, Galectin3, Chemerin [166] bzw. CMKLR1 [166] in den Präadipozyten (B).

4.3 Einfluss insulinsensitiverender Medikamente auf die Expression der untersuchten Proteine

Neben der Expression im subkutanen und viszeralen Fettgewebe und dem Einfluss der Adipositas war auch der Einfluss von Medikamenten, welche zur Behandlung der Adipositas assoziierten Insulinresistenz eingesetzt werden, auf die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine von Interesse.

Während Metformin keinen Einfluss auf die Expression der AOX1 in Adipozyten zeigte, waren sowohl Pioglitazon als auch Fenofibrat in der Lage die Expression von AOX1 zu reprimieren. Bei der durch den PPAR α Agonisten Fenofibrat vermittelten Reduktion handelt es sich um einen PPAR α spezifischen Effekt, der durch einen PPAR α spezifischen Antagonisten inhibiert werden konnte. Hingegen handelt es sich bei Reduktion durch Pioglitazon um einen PPAR γ unabhängigen Effekt, der sich durch einen PPAR γ spezifischen Antagonisten nicht unterdrücken ließ.

Die Expression von SOD2 in Adipozyten wurde, wie die Expression von AOX1, nicht durch Metformin reguliert, obwohl Metformin durch die Steigerung der Lipolyse und β -Oxidation zu einer Reduktion der Triglyzeride und zu einer Zunahme der ROS führt [275]. Ebenso zeigte Pioglitazon keinen Einfluss auf die Expression von SOD2 in Adipozyten. Für Pioglitazon wurde eine Verminderung der durch TNF α induzierten ROS Menge beschrieben [110]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit sprechen jedoch gegen eine Rolle der SOD2 in diesem Zusammenhang. Die Aktivierung von PPAR α durch Fenofibrat oder einem spezifischen PPAR α Agonisten hingegen vermochte die Expression von SOD2 in 3T3-L1 Adipozyten deutlich zu reduzieren. Die Aktivierung von PPAR α ist mit dem verstärkten Abbau von Fettsäuren und der Inhibierung proinflammatorischer Signalwege wie z.B. NF κ B verbunden [76]. Ob diese Veränderungen allerdings auch die Reduktion der SOD2 Expression erklären könnten, bedarf weiterer Untersuchungen.

Metformin zeigte keinen Einfluss auf die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine AOX1, SOD2, Annexin A6, Chemerin und CMKLR1 in Adipozyten mit Ausnahme von Galectin 3, welches es reduzierte. Adiponektin war ebenfalls in der Lage die Expression von Galectin 3 zu reprimieren. Da sowohl Metformin als auch Adiponektin die AMPK aktivieren, könnte Metformin durch Aktivierung der AMPK direkt die Expression von Galectin 3 regulieren [65, 276]. Übereinstimmend hiermit war in Typ 2 Diabetikern unter Metforminbehandlung die Serumkonzentration von Galectin 3 signifikant niedriger. Da die Serumkonzentration von Galectin 3 nicht mit der von Adiponektin korrelierte, dürfte

Adiponektin wohl nicht der bestimmende Faktor für die Menge des zirkulierenden Galectin 3 sein.

Auf die Expression von Annexin A6, Chemerin und CMKLR1 in Adipozyten hatte eine Stimulation mit Metformin, Pioglitazon und Fenofibrat keine Auswirkung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch das Fettgewebe bzw. Adipozyten durch PPAR α Agonisten bzw. Metformin beeinflusst werden können. Bislang wurde die Wirkung insulinsensitivierender Medikamente auf Adipozyten und das Fettgewebe mit Ausnahme der Glitazone wenig untersucht. Ähnliche Experimente wie die hier beschriebenen Versuche könnten zum einen die Wirkweise gängiger Medikamente aufklären aber auch zur Entwicklung neuer Strategien bei der Behandlung der Adipositas führen. Neben in vitro Untersuchungen wären hier aber auch Tierversuche und Analysen geeigneter humaner Biopsien gefragt.

4.4 Serumkonzentration und Einfluss der untersuchten Adipozytokine auf die Leber

Omentin, Galectin 3 und Chemerin werden vom Fettgewebe sezerniert und gehören daher zur wachsenden Familie der Adipozytokine. Da alle drei Proteine vermehrt im viszeralen Fettgewebe nachgewiesen werden konnten, sollte im Zusammenhang mit dem *Portal Paradigm* die Serumkonzentration der Proteine im Typ 2 Diabetes und in der Adipositas bestimmt sowie die Konzentration im portalvenösen Blut im Vergleich zum hepatischen bzw. systemisch venösen Blut analysiert werden und die Wirkung dieser Proteine auf humane Hepatozyten untersucht werden.

Die Serumkonzentration von Omentin konnte mangels eines geeigneten Detektionssystems in humanen Seren nicht bestimmt werden. Auch lieferte die Expressionanalyse von humanen Hepatozyten nach Stimulation mit Omentin nur wenige regulierte Gene, obwohl eine Stimulation von Hepatozyten mit Omentin die Insulinsignaltransduktion wie zuvor in Adipozyten beschreiben zu verstärken vermochte [121]. Die Regulation der Kandidatengene muss ebenso wie die der Galectin 3 und Chemerin Expressionsanalysen noch verifiziert werden.

Die Serumkonzentration von Galectin 3 war, wie die meisten der bislang untersuchten Adipozytokine, in der Adipositas erhöht [47, 277]. Im Gegensatz zu Leptin und Adiponektin war Galectin 3 im Serum von Frauen nicht erhöht und zeigte keinen geschlechtsspezifischen Dimorphismus in Typ 2 Diabetes Patienten. Die Serumspiegel von

Galectin 3 zeigten eine positive Korrelation mit Leptin, Resistin, Alter sowie WHR und BMI. Diese Korrelationen hatten nach Korrektur für BMI und WHR jedoch keinen Bestand. Im Serum von Typ 2 Diabetes Patienten mit einem erhöhten CRP war Galectin 3 signifikant höher. Höhere Galectin 3 Serumspiegel wurden zudem in Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn und systemischer Lupus Erythematosus, und Karzinomen, wie Melanom und Leberzellkarzinom, detektiert, was für eine allgemeine Assoziation von höheren Galectin 3 Konzentrationen mit Entzündungsreaktionen spricht [147, 148, 151]. Da systemisches Galectin 3 keine Korrelation zum Gesamthämoglobin zeigte, ist eine Rolle von Galectin 3, das unter anderem auch an Haptoglobin bindet, im Abbau von Hämoglobin allgemein eher unwahrscheinlich. Galectin 3 könnte jedoch spezifisch den Abbau von glykiertem Hämoglobin beschleunigen, dessen Aufnahme in Makrophagen über den *Scavenger Receptor* CD163 im Vergleich zu unglykiertem Hämoglobin vermindert ist [278, 279]. Eine reduzierte Menge von AGE geht aber auch mit weniger ROS und somit einer verminderten Glykierung von HbA1c einher. Daher könnte auch eine verminderte Bildung von HbA1c durch einen indirekten Effekt von Galectin 3 vermutet werden. In Typ 2 Diabetikern unter Metforminbehandlung war zudem die Serumkonzentration von Galectin 3 signifikant niedriger. Dies könnte auf eine Aktivierung der AMPK in Adipozyten zurückzuführen sein.

Eine erhöhte Menge viszeralen Fettgewebes kann zur beobachteten chronischen Entzündung in adipösen Personen beitragen. Die Menge von Adipozytokinen in der Pfortader könnte dabei durch ihre direkte Wirkung auf die Leber von entscheidender Bedeutung sein [47]. Untersuchungen zu Konzentrationen von Adipozytokinen in der Pfortader sind bislang jedoch rar [50]. Galectin 3 wird im viszeralen Fettgewebe deutlich stärker exprimiert als im subkutanen Fettgewebe. Eine Untersuchung des Beitrages des viszeralen Fettgewebes zur systemischen Galectin 3 Menge durch Bestimmung der Galectin 3 Konzentration in portalvenösen, systemisch venösen und systemisch arteriellen Serum zeigte eine signifikant höhere Menge an Galectin 3 im portalvenösen Serum im Vergleich zum systemisch venösen Serum auf. Die nachweisbare höhere Menge an Galectin 3 in der Pfortader könnte auf einen wesentlichen Beitrag des durch das viszerale Fettgewebe sezernierten Galectin 3 an dessen Gesamtserumkonzentration hinweisen. Die Daten schließen aber auch eine Freisetzung von Galectin 3 durch die Milz oder den Darm nicht aus.

Galectin 3 gelangt in höheren Mengen über die Pfortader in die Leber. Viele Proteine werden von der Leber aufgenommen und dies kann zur Regulation ihrer systemischen

Konzentration beitragen. Des Weiteren können diese Proteine aber auch durch ihre direkte Wirkung auf die Leber von entscheidender Bedeutung für die Funktion dieses Organs sein. Die Auswertung der Genexpressionanalyse der mit Galectin 3 stimulierten primären humanen Hepatozyten zeigte u.a. eine Abnahme von FABP3, FABP4, FABP5 und Follistatin, welche protektiv der Entstehung einer NAFLD entgegenwirken könnten. Dies steht im Widerspruch mit den bei adipösen und diabetischen Patienten detektierten erhöhten Galectin 3 Mengen und ihrem erhöhten Risiko für eine hepatische Steatose [2]. Allerdings übt Galectin 3 in metabolischen Erkrankungen verschiedene Funktionen aus. In der Insulinresistenz fördert Galectin 3 so zum einen die Entzündung, wirkt aber zum anderen durch Reduktion der AGE gleichzeitig Gewebeschäden entgegen. Galectin 3 defiziente Mäuse weisen dementsprechend eine geringere Entzündung aber auch vermehrte sekundäre Schäden durch die erhöhten Ablagerungen von AGE in der Niere und der Leber auf [158, 161].

Da eine Expression von Chemerin im Fettgewebe und in Adipozyten in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur nachgewiesen werden konnte, jedoch zu Beginn dieser Arbeit lediglich eine ähnlich hohe Serumkonzentration von Chemerin in diabetischen und nicht diabetischen Spendern mit vergleichbaren BMI beschrieben war, sollte in dieser Arbeit die Konzentration von Chemerin im Serum von normalgewichtigen, übergewichtigen und diabetischen Probanden sowie im Pfortaderblut gemessen werden [165-167, 181, 185]. Es zeigte sich, dass das systemische Chemerin wie das systemische Galectin 3 in der Adipositas erhöht ist und keinen geschlechtspezifischen Dimorphismus zeigt. Die Serumkonzentration von Chemerin korrelierte negativ mit dem HDL-Cholesterin und positiv mit dem BMI, WHR und CRP sowie mit den systemischen Leptin- und Resistinspiegeln der Probanden. Weiterhin lagen wie bei Galectin 3 unabhängig vom BMI höhere Chemerinkonzentrationen im Serum von Typ 2 Diabetikern mit einem erhöhten CRP vor. Ein Ergebnis, dass für eine Assoziation von Chemerin mit einer Entzündungsreaktion und nicht mit Adipositas spricht. Zudem konnte kein Unterschied in der Chemerinkonzentration zwischen portalvenösen und systemischen Serumproben festgestellt werden. Chemerin dürfte folglich im Menschen nicht überwiegend vom subkutanen oder viszeralen Fettgewebe in die Zirkulation abgegeben werden. Da durch die Bestimmung der absoluten Chemerinkonzentration im Serum jedoch keine Aussage über den Anteil des aktiven Chemerins gemacht werden kann, müssten hierzu noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die Auswertung der Genexpressionanalyse der mit

Chemerin stimulierten primären humanen Hepatozyten lieferte nur wenige Kandidatengene, deren Regulation noch verifiziert werden müsste.

5 Zusammenfassung

Die Adipositas, insbesondere das Vorliegen einer viszeralen Adipositas, ist mit einem erhöhten Risiko für metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch einen Vergleich von gepaarten Proben humanen subkutanen und viszeralen Fettgewebes neue Adipozytokine, welche vermehrt vom viszeralen Fettgewebe synthetisiert werden, zu identifizieren und anschließend genauer zu charakterisieren.

Hierfür wurden gepaarte humane subkutane und viszerale Fettgewebeproben und primäre humane Präadipozyten und Adipozyten verwendet, sowie Fettgewebeproben von C57BL/6 Mäusen, Hochfettmatten und Zuckerratten und die murine Adipozytenzelllinie 3T3-L1. Des Weiteren wurden die sezernierten Adipozytokine im Serum von normalgewichtigen, übergewichtigen und diabetischen Probanden und im portalvenösen und systemisch venösen Serum von humanen Spendern bestimmt.

Es wurden sechs Proteine untersucht. AOX1 und SOD2 sind zwei der wichtigsten Enzyme für die Regulation zellulärer ROS. Galectin 3 und Chemerin regulieren die Funktion von Immunzellen und sind bei entzündlichen Erkrankungen erhöht. Annexin A6 beeinflusst die Aufnahme und zelluläre Verteilung von Cholesterin. Omentin war bereits als ein vermehrt vom viszeralen Fettgewebe freigesetztes Adipokin beschrieben.

In den gepaarten subkutanen und viszeralen Fettgewebeproben von zehn Spendern konnte eine stärkere Expression von Annexin A6, Omentin und Galectin 3 im viszeralen Fettgewebe sowie eine stärkere Expression von SOD2 im subkutanen Fettgewebe nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster war auch im subkutanen und viszeralen Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen zu detektieren. Die Expression von AOX1 war im humanen Fettgewebe individuell sehr unterschiedlich und zeigte keine Präferenz für ein Fettgewebsdepot. Eine Expression von Chemerin und CMKLR1 konnte in den humanen Fettgewebeproben nicht detektiert werden. Daneben wurde in den humanen Proben eine höhere Expression von PI3K und CD163 im viszeralen und von Adiponektin, Adipophilin, ApoE und Flotillin 1 im subkutanen Fettgewebe festgestellt.

Eine vermehrte Expression in der Adipositas konnte im Tiermodell der Hochfettmatten für SOD2, Annexin A6 und Omentin nachgewiesen werden. Die Expression von AOX1 hingegen nahm ausschließlich im Fettgewebe adipöser als auch insulinresistenter Ratten ab, begleitet von einer gleichzeitigen Reduktion von PPAR γ , und dieses Expressionsmuster konnte im Tiermodell der Zuckerratte bestätigt werden. Auf Grund einer Induktion von

Annexin A6 im subkutanen Fettgewebe der insulinresistenten Zuckerratten kam es zudem zu einem Verlust des fettdepotspezifisch differenziellen Expressionsmusters.

Im Verlauf der Differenzierung von murinen 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten konnte eine frühe Expression von AOX1 und PPAR α am Tag 1 und Tag 2 der Adipogenese nachgewiesen werden, während die Expression des intermediären Differenzierungsmarkers PPAR γ erst am Tag 3 und Tag 6 der Differenzierung anstieg. Die Expression von Annexin A6 und SOD2 nahm im Verlauf der neuntägigen Differenzierung stetig zu, wobei die Induktion von SOD2 wesentlich stärker war. Die Expression von Chemerin wurde hingegen ausschließlich in reifen Adipozyten induziert, während dessen Rezeptor CMKLR1 ausschließlich am ersten Tag der Adipogenese verstärkt exprimiert wurde. Lediglich für Galectin 3 wurde eine stärkere Expression in Präadipozyten detektiert. In primären humanen Präadipozyten und Adipozyten konnte eine Zunahme von AOX1, SOD2, Annexin A6 und Chemerin in den reifen Adipozyten bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Zelllinie war in den humanen Adipozyten auch die Expression von Galectin 3 und CMKLR1 in den reifen Zellen induziert. Des Weiteren zeigte sich eine vermehrte Expression von FABP4, SCD1, ApoE, PI3K, Flotillin 1 und β -Aktin in den reifen humanen Adipozyten.

Eine Stimulation mit Fettsäuren oder Endotoxin, welche in der Adipositas systemisch erhöht sind, führte zu einer Induktion der Expression von SOD2, Galectin 3 und Chemerin in 3T3-L1 Adipozyten. Insulin als auch hyperglykämische Mengen Glukose waren in der Lage Chemerin in Adipozyten zu reduzieren und CMKLR1 zu induzieren. Galectin 3 wurde durch Insulin jedoch nicht durch Glukose erhöht. Unter hyperglykämischen Bedingungen zeigte sich eine verminderte Induktion von CMKLR1 und Galectin 3 nach Stimulation mit Insulin. Auf die Expression von SOD2 und Annexin A6 hatten weder Insulin noch Glukose einen Einfluss.

Insulinsensitivierende Medikamente zeigten unterschiedliche Effekte auf die Expression der untersuchten Proteine in Adipozyten. Annexin A6, Chemerin und CMKLR1 wurden weder durch den AMPK Aktivator Metformin noch durch den PPAR γ Agonisten Pioglitazon oder den PPAR α Agonisten Fenofibrat verändert. Pioglitazon war in der Lage die Expression von AOX1 unabhängig von einer PPAR γ Aktivierung zu reduzieren. Fenofibrat führte zu PPAR α vermittelten Reduktion von sowohl AOX1 als auch SOD2. Metformin, wie auch Adiponektin, reprimierten die Expression von Galectin 3.

Ein Knock-down von AOX1, SOD2 und Galectin 3 mittels siRNA in 3T3-L1 Präadipozyten resultierte in einer verminderten Differenzierung der Zellen, einer geringeren

Zahl von Lipidtropfen, einer reduzierten Speicherung von Triglyzeriden und einer erniedrigten Freisetzung von Adiponektin. Ein ähnlicher Phänotyp zeigte sich bei Überexpression von Annexin A6 während der Adipogenese. Goralski und Kollegen beschrieben auch für Chemerin und CMKLR1 eine gestörte Differenzierung nach Knock-down in Präadipozyten [166].

Die Serumkonzentrationen von Galectin 3 und Chemerin waren in der Adipositas erhöht. Da die erhöhten Serumspiegel der beiden Proteine unabhängig vom BMI mit dem CRP der Spender korrelierten, dürfte eine Assoziation der Galectin3 und Chemerin Serumkonzentrationen mit einer Entzündungsreaktion und nicht mit der Adipositas an sich vorliegen. Männer und Frauen wiesen keine unterschiedlichen Serummengen von Galectin 3 oder Chemerin auf. Serum Galectin 3 war in diabetischen Spendern unter Therapie mit Metformin erniedrigt und korrelierte negativ mit HbA1c. Im Vergleich zum systemisch venösen Serum zeigte sich im portalvenösen Serum eine höhere Konzentration von Galectin 3 nicht jedoch von Chemerin. Das viszerale Fettgewebe dürfte demnach signifikant zur systemischen Serumkonzentration von Galectin 3 beitragen, während dies bei Chemerin nicht der Fall ist.

6 Publikationen und Kongressbeiträge

6.1 Publikationen

6.1.1 Erstautorenschaften

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, M. Filarsky, S. Bauer, R. Wiest, S. Farkas, M. N. Scherer, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. Clin Endocrinol (Oxf.) 2009 Jun 24. [Epub ahead of print]

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, F. Schober, D. Sporrer, M. Weber, A. Schramm, S. Wurm, F. Stögbauer, M. Filarsky, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes. Cytokine 2009 Feb;45(2):86-91.

J. Weigert, M. Neumeier, S. Bauer, W. Mages, A. A. Schnitzbauer, A. Obed, B. Gröschl, A. Hartmann, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. FEBS Lett. 2008 Aug 20;582(19):2965-72.

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, S. Wurm, A. Kopp, F. Schober, M. Filarsky, A. Schäffler, M. Zeitoun, C. Aslanidis, C. Buechler: Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes. FEBS Lett. 2008 May 28;582(12):1777-82.

J. Weigert, M. Neumeier, A. Schäffler, M. Fleck, J. Schölmerich, C. Schütz, C. Buechler: The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells. FEBS Lett. 2005 Oct 24;579(25):5565-70.

6.1.2 Koautorenschaften

J. Wanninger, M. Neumeier, **J. Weigert**, S. Bauer, T. S. Weiss, A. Schäffler, C. Kreml, C. Bleyl, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NFκB, and STAT3 signalling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Jul 16. [Epub ahead of print]

A. Kopp, P. Gross, W. Falk, M. Bala, **J. Weigert**, C. Buechler, M. Neumeier, J. Schölmerich, A. Schäffler: Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity. *Eur J Clin Invest*. 2009 Jul 26. [Epub ahead of print]

D. Sporrer, M. Weber, J. Wanninger, **J. Weigert**, M. Neumeier, F. Stögbauer, E. Lieberer, M. Bala, A. Kopp, A. Schäffler, C. Buechler: Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur J Clin Invest*. 2009 Aug; 39(8):671-9.

F. Stögbauer, **J. Weigert**, M. Neumeier, J. Wanninger, D. Sporrer, M. Weber, A. Schäffler, C. Enrich, P. Wood, T. Grewal, C. Aslanidis, C. Buechler: Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro. *Exp Mol Med*. 2009 Mar 26. [Epub ahead of print]

R. Wiest, F. Leidl, A. Kopp, **J. Weigert**, M. Neumeier, C. Buechler, J. Schölmerich, A. Schäffler: Peritoneal fluid adipokines: ready for prime time? *Eur J Clin Invest*. 2009 Mar; 39(3):219-29.

A. Kopp, C. Buechler, M. Neumeier, **J. Weigert**, C. Aslanidis, J. Schölmerich, A. Schäffler: Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Apr; 17(4):648-56.

S. Wurm, M. Neumeier, **J. Weigert**, J. Wanninger, M. Gerl, A. Gindner, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Insulin induces monocytic CXCL8 secretion by the mitogenic signalling pathway. *Cytokine*. 2008 Oct;44(1):185-90.

F. Stögbauer, M. Neumeier, **J. Weigert**, J. Wanninger, M. Grandl, K. Lehle, G. Schmitz, C. Aslanidis, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler: Highly efficient and low-cost method to isolate human blood monocytes with high purity. *J Immunol Methods*. 2008 Aug 20;337(1):78-80.

J. Wanninger, M. Neumeier, **J. Weigert**, G. Liebisch, T.S. Weiss, A. Schäffler, C. Aslanidis, G. Schmitz, J. Schölmerich, C. Buechler: Metformin reduces cellular lysophosphatidylcholine and thereby may lower apolipoprotein B secretion in primary human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jun-Jul;1781(6-7):321-5.

B. Wölfling, C. Buechler, **J. Weigert**, M. Neumeier, C. Aslanidis, J. Schölmerich, A. Schäffler: Effects of the new C1q/TNF-related protein (CTRP-3) "cartonectin" on the adipocytic secretion of adipokines. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jul;16(7):1481-6.

F. Schober, M. Neumeier, **J. Weigert**, S. Wurm, J. Wanninger, A. Schäffler, A. Dada, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, C. Buechler: Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 5;361(4): 968-73.

M. Neumeier, **J. Weigert**, R. Buettner, J. Wanninger, A. Schäffler, A. M. Muller, S. Killian, S. Sauerbruch, F. Schlachetzki, A. Steinbrecher, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Oct;293(4): E965-969.

S. Wurm, M. Neumeier, **J. Weigert**, A. Schäffler, C. Buechler: Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults. *Cardiovasc Diabetol*. 2007 Feb 20;6:7.

A. Schäffler, **J. Weigert**, M. Neumeier, J. Schölmerich, C. Buechler: Regulation and function of collagenous repeat containing sequence of 26-kDa protein gene product "cartonectin". *Obesity (Silver Spring)* 2007 Feb;15(2):303-13.

M. Neumeier, A. Sigrüener, E. Eggenhofer, **J. Weigert**, T. S. Weiss, A. Schaeffler, H. J. Schlitt, C. Aslanidis, P. Piso, T. Langmann, G. Schmitz, J. Schölmerich, C. Buechler: High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 12;352(2):543-8.

M. Neumeier, **J. Weigert**, A. Schäffler, T. S. Weiss, C. Schmidl, R. Büttner, C. Bollheimer, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Nov 24;350(3):731-5.

M. Neumeier, C. Hellerbrand, E. Gäbele, R. Buettner, C. Bollheimer, **J. Weigert**, A. Schäffler, T. S. Weiss, M. Lichtenauer, J. Schölmerich, C. Buechler: Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2006 Sep 14;12 (34): 5490-4.

S. Abke, M. Neumeier, **J. Weigert**, G. Wehrwein, E. Eggenhofer, A. Schäffler, K. Maier, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Adiponectin-induced secretion of interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2) and interleukin-8 (IL-8, CXCL8) is impaired in monocytes from patients with type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2006 Aug 30;5:17.

G. Wehrwein, M. Neumeier, A. Schäffler, A. Kopp, **J. Weigert**, S. Abke, J. Schölmerich, C. Buechler: Lipopolysaccharide regulated protein expression is only partly impaired in monocytes from patients with type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2006 Mar 27;5:5.

M. Neumeier, **J. Weigert**, A. Schäffler, G. Wehrwein, U. Müller-Ladner, J. Schölmerich, C. Wrede, and C. Buechler: Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol*. 2006 Apr;79 (4): 803-8.

M. Neumeier, **J. Weigert**, A. Schäffler, T. Weiss, S. Kirchner, S. Laberer, J. Schölmerich, C. Buechler: Regulation of adiponectin receptor 1 in human hepatocytes by agonists of nuclear receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 2;334(3):924-9.

C. Buechler, M. Neumeier, **J. Weigert**: Response to Kadowaki et al. AdipoR2 is a 43 kDa protein. Letter to the Editor: J Clin Invest., July 2006:

6.1.3 Eingereichte Publikationen

J. Weigert, S. Bauer, M. Neumeier, J. Wanninger, A. Luchner, C. Bollheimer, R. Büttner, C. Morgenthaler, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Hyperlipidemia but not hyperglycemia is associated with elevated superoxide dismutase 2 in the epididymal fat of rats.

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, S. Bauer, R. Büttner, S. Farkas, M. N. Scherer, A. Schnitzbauer, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Visceral fat may contribute to elevated systemic galectin-3 in human obesity.

J. Weigert, S. Bauer, J. Wanninger, M. Neumeier, C. Dorn, C. Hellerbrand, A. Schäffler, N. Zimara, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler: Cellular and soluble chemerin levels are increased by lipopolysaccharide and free fatty acids while glucose and insulin increase the soluble but reduce the cellular form in adipocytes.

6.2 Kongressbeiträge

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, S. Bauer, M. Filarsky, R. Wiest, S. Farkas, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler: Systemic chemerin is elevated in human obesity. Annual Rachmiel Levine Diabetes Symposium, Anaheim, CA, 18.-21.03.2009.

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, S. Bauer, M. Filarsky, R. Wiest, S. Farkas, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler: Systemic chemerin is elevated in human obesity. 3rd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome, Nice, 1.-4. 04.2009.

J. Weigert, S. Bauer, M. Neumeier, J. Wanninger, A. A. Schnitzbauer, A. Obed, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler: Aldehyde oxidase 1 knock-down in adipocytes is associated with a reduced secretion of adiponectin. European Lipoprotein Club 31st Annual Meeting, Tutzing, 8.-11.09.2008.

J. Weigert, M. Neumeier, H. Brühl, C. Bollheimer, R. Büttner, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler: Adiponectin stimulates monocytic release of CCL2,-3,-4 and -5 and concomitantly reduces the surface abundance of CCR1,-2 and -5.

10th European Congress of Endocrinology, Berlin, 3.-7.05.2008.

J. Weigert, M. Neumeier, A. Schäffler, M. Fleck, J. Schölmerich, C. Schütz, C. Buechler: The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells.

European Lipoprotein Club 28th Annual Meeting, Tutzing, 12.-15.09.2005.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Betreuung dieser Arbeit, die Diskussionsbereitschaft und die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Christa Büchler für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, für die großartige Betreuung, die vielen Erklärungen und Diskussionen, für Ihre Geduld und Hilfe bei Problemen und Fragen, das Korrekturlesen, das Erstellen des Zweitgutachtens und für Vieles mehr.

Bei Herrn Prof. Dr. Ernst R. Tamm bedanke ich mich für die Bereitschaft, den dritten Prüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Sprenger bedanke ich mich für die Bereitschaft, den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.

Herrn Dr. Thomas Grewal möchte ich für die Bereitstellung der Annexin A6 Plasmide danken.

Bei Prof. Dr. Andreas Schäffler, PD Dr. Reiner Wiest, PD Dr. Stefan Farkas, Dr. Markus Neumeier, Dipl. Biol. Andrea Kopp, Dipl. Biol. Sabine Abke, Dr. med. Sylvia Wurm und Dres. cand. med. Franziska Schober, Margarita Bala, Daniela Sporrer und Markus Weber möchte ich mich für die Bereitstellung der Serumproben bedanken.

Dr. Andreas Schnitzbauer und Dr. Aiman Obed danke ich für die Asservierung der humanen Fettgewebeproben.

Herrn PD Dr. Thomas Weiss und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Bereitstellung der primären humanen Hepatozyten danken.

Prof. Dr. Andreas Luchner, PD. Dr. Roland Büttner, PD. Dr. Cornelius Bollheimer und Dr. Elke Eggenhofer danke ich für die Bereitstellung der Fettgewebeproben ihrer Versuchstiere.

Prof. Dr. Arndt Hartmann danke ich für die Beurteilung der immunhistochemischen Färbung.

Sabrina Bauer und Markus Neumeier möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der SOD2 und Galectin 3 siRNA Versuche danken.

Bei Sabrina Bauer möchte ich mich auch ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Präparation und Analyse der Fettgewebeproben bedanken.

Unseren Praktikantinnen und Praktikanten Christian Schmidl, Christoph Morgenthaler, Benjamin Gröschl, Verena Königer und Nicole Zimara danke ich für ihre Mitarbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Sabrina Bauer, Andrea Kopp, Kerstin Winkler, Tanja Späth, Sylvia Wurm, Franziska Schober, Markus Neumeier, Michael Filarsky, Fabian Stögbauer und Josef Wanninger möchte ich für ihre Freundschaft, die gute Arbeitsatmosphäre, ihre kollegiale Unterstützung und die vielen lustigen Gespräche im Labor danken.

Kathrin, Andi, Sally, Tanja und Martin danke ich für ihre Freundschaft und für Aufmunterung und Rückhalt während der heißen Phase meiner Promotion.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter, Clara Weigert, und meiner Schwester Teresa für ihre beständige und uneingeschränkte Unterstützung!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Regensburg, den 21.07.2009

Johanna Weigert

7 Literaturverzeichnis

- [1] D. E. Moller, and K. D. Kaufman, Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective, *Annu Rev Med* 56 (2005) 45-62.
- [2] R. H. Eckel, S. M. Grundy, and P. Z. Zimmet, The metabolic syndrome, *Lancet* 365 (2005) 1415-1428.
- [3] E. Oda, The metabolic syndrome as a concept of adipose tissue disease, *Hypertens Res* 31 (2008) 1283-1291.
- [4] E. E. Kershaw, and J. S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ, *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 2548-2556.
- [5] M. Lafontan, and M. Berlan, Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights?, *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003) 276-283.
- [6] Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, *World Health Organ Tech Rep Ser* 894 (2000) i-xii, 1-253.
- [7] H. Tilg, and A. R. Moschen, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity, *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 772-783.
- [8] J. G. Fan, and G. C. Farrell, VAT fat is bad for the liver, SAT fat is not!, *J Gastroenterol Hepatol* 23 (2008) 829-832.
- [9] D. B. Carr, K. M. Utzschneider, R. L. Hull, K. Kodama, B. M. Retzlaff, J. D. Brunzell, J. B. Shofer, B. E. Fish, R. H. Knopp, and S. E. Kahn, Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome, *Diabetes* 53 (2004) 2087-2094.
- [10] M. C. Pouliot, J. P. Despres, S. Lemieux, S. Moorjani, C. Bouchard, A. Tremblay, A. Nadeau, and P. J. Lupien, Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women, *Am J Cardiol* 73 (1994) 460-468.
- [11] J. P. Despres, and I. Lemieux, Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature* 444 (2006) 881-887.
- [12] N. Ruderman, D. Chisholm, X. Pi-Sunyer, and S. Schneider, The metabolically obese, normal-weight individual revisited, *Diabetes* 47 (1998) 699-713.
- [13] A. Thorne, F. Lonnqvist, J. Apelman, G. Hellers, and P. Arner, A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding, *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 (2002) 193-199.
- [14] S. Klein, L. Fontana, V. L. Young, A. R. Coggan, C. Kilo, B. W. Patterson, and B. S. Mohammed, Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease, *N Engl J Med* 350 (2004) 2549-2557.

-
- [15] P. Trayhurn, Adipocyte biology, *Obes Rev* 8 Suppl 1 (2007) 41-44.
- [16] N. Abate, and A. Garg, Heterogeneity in adipose tissue metabolism: causes, implications and management of regional adiposity, *Prog Lipid Res* 34 (1995) 53-70.
- [17] A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buchler, Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2 (2005) 103-111.
- [18] K. Rabe, M. Lehrke, K. G. Parhofer, and U. C. Broedl, Adipokines and insulin resistance, *Mol Med* 14 (2008) 741-751.
- [19] J. N. Fain, A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema, and S. W. Bahouth, Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans, *Endocrinology* 145 (2004) 2273-2282.
- [20] S. Perrini, A. Leonardini, L. Laviola, and F. Giorgino, Biological specificity of visceral adipose tissue and therapeutic intervention, *Arch Physiol Biochem* 114 (2008) 277-286.
- [21] Y. Arita, S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 79-83.
- [22] M. Iwaki, M. Matsuda, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Makishima, and I. Shimomura, Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Antidiabetic and Antiatherogenic Factor, by Nuclear Receptors, *Diabetes* 52 (2003) 1655-1663.
- [23] E. Hu, P. Liang, and B. M. Spiegelman, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity, *J Biol Chem* 271 (1996) 10697-10703.
- [24] J. J. Diez, and P. Iglesias, The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease, *Eur J Endocrinol* 148 (2003) 293-300.
- [25] B. Zietz, H. Herfarth, G. Paul, A. Ehling, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, and A. Schaffler, Adiponectin represents an independent cardiovascular risk factor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes, *FEBS Lett* 545 (2003) 103-104.
- [26] M. E. Trujillo, and P. E. Scherer, Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome, *J Intern Med* 257 (2005) 167-175.
- [27] H. Waki, T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki, Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and multimer formation of adiponectin, *J Biol Chem* (2003).
- [28] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T.

Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, and T. Kadowaki, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature* 423 (2003) 762-769.

[29] N. Kubota, W. Yano, T. Kubota, T. Yamauchi, S. Itoh, H. Kumagai, H. Kozono, I. Takamoto, S. Okamoto, T. Shiuchi, R. Suzuki, H. Satoh, A. Tsuchida, M. Moroi, K. Sugi, T. Noda, H. Ebinuma, Y. Ueta, T. Kondo, E. Araki, O. Ezaki, R. Nagai, K. Tobe, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Minokoshi, and T. Kadowaki, Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake, *Cell Metab* 6 (2007) 55-68.

[30] M. Okamoto, M. Ohara-Imaizumi, N. Kubota, S. Hashimoto, K. Eto, T. Kanno, T. Kubota, M. Wakui, R. Nagai, M. Noda, S. Nagamatsu, and T. Kadowaki, Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration, *Diabetologia* 51 (2008) 827-835.

[31] J. Fruebis, T. S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain, and H. F. Lodish, Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 2005-2010.

[32] A. H. Berg, T. P. Combs, X. Du, M. Brownlee, and P. E. Scherer, The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action, *Nat Med* 7 (2001) 947-953.

[33] T. Yamauchi, J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M. L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, and T. Kadowaki, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity, *Nat Med* 7 (2001) 941-946.

[34] N. Rasouli, B. Molavi, S. C. Elbein, and P. A. Kern, Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome, *Diabetes Obes Metab* 9 (2007) 1-10.

[35] T. P. Combs, A. H. Berg, S. Obici, P. E. Scherer, and L. Rossetti, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30, *J Clin Invest* 108 (2001) 1875-1881.

[36] A. Xu, Y. Wang, H. Keshaw, L. Y. Xu, K. S. Lam, and G. J. Cooper, The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice, *J Clin Invest* 112 (2003) 91-100.

[37] T. Kadowaki, and T. Yamauchi, Adiponectin and adiponectin receptors, *Endocr Rev* 26 (2005) 439-451.

[38] J. P. Whitehead, A. A. Richards, I. J. Hickman, G. A. Macdonald, and J. B. Prins, Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome, *Diabetes Obes Metab* 8 (2006) 264-280.

[39] O. Gualillo, J. R. Gonzalez-Juanatey, and F. Lago, The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives, *Trends Cardiovasc Med* 17 (2007) 275-283.

-
- [40] S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J Clin Invest* 112 (2003) 1796-1808.
- [41] C. N. Lumeng, S. M. Deyoung, J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel, Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity, *Diabetes* 56 (2007) 16-23.
- [42] R. R. Banerjee, and M. A. Lazar, Resistin: molecular history and prognosis, *J Mol Med* 81 (2003) 218-226.
- [43] H. E. Lebovitz, and M. A. Banerji, Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance, *Diabetes Care* 28 (2005) 2322-2325.
- [44] S. Nielsen, Z. Guo, C. M. Johnson, D. D. Hensrud, and M. D. Jensen, Splanchnic lipolysis in human obesity, *J Clin Invest* 113 (2004) 1582-1588.
- [45] A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buchler, Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2 (2005) 273-280.
- [46] H. Ghanim, A. Aljada, N. Daoud, R. Deopurkar, A. Chaudhuri, and P. Dandona, Role of inflammatory mediators in the suppression of insulin receptor phosphorylation in circulating mononuclear cells of obese subjects, *Diabetologia* 50 (2007) 278-285.
- [47] G. R. Hajer, T. W. van Haeften, and F. L. Visseren, Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases, *Eur Heart J* 29 (2008) 2959-2971.
- [48] X. Yang, and U. Smith, Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer?, *Diabetologia* 50 (2007) 1127-1139.
- [49] A. M. Sharma, and B. Staels, Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism, *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2007) 386-395.
- [50] L. Fontana, J. C. Eagon, M. E. Trujillo, P. E. Scherer, and S. Klein, Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans, *Diabetes* 56 (2007) 1010-1013.
- [51] M. A. Lazar, How obesity causes diabetes: not a tall tale, *Science* 307 (2005) 373-375.
- [52] H. Xu, G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia, and H. Chen, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J Clin Invest* 112 (2003) 1821-1830.
- [53] C. A. Curat, A. Miranville, C. Sengenès, M. Diehl, C. Tonus, R. Busse, and A. Bouloumie, From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes, *Diabetes* 53 (2004) 1285-1292.
- [54] Y. D. Tchoukalova, M. G. Sarr, and M. D. Jensen, Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287 (2004) R1132-1140.

-
- [55] M. Lehrke, and M. A. Lazar, Inflamed about obesity, *Nat Med* 10 (2004) 126-127.
- [56] P. Tontonoz, and B. M. Spiegelman, Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma, *Annu Rev Biochem* 77 (2008) 289-312.
- [57] P. A. Permana, C. Menge, and P. D. Reaven, Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance, *Biochem Biophys Res Commun* 341 (2006) 507-514.
- [58] K. E. Wellen, and G. S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes, *J Clin Invest* 115 (2005) 1111-1119.
- [59] T. B. Chaston, and J. B. Dixon, Factors associated with percent change in visceral versus subcutaneous abdominal fat during weight loss: findings from a systematic review, *Int J Obes (Lond)* 32 (2008) 619-628.
- [60] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and D. E. Moller, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J Clin Invest* 108 (2001) 1167-1174.
- [61] P. J. Barter, and K. A. Rye, Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 39-46.
- [62] J. M. Lehmann, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, and S. A. Kliewer, An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), *J Biol Chem* 270 (1995) 12953-12956.
- [63] D. J. Betteridge, Effects of pioglitazone on lipid and lipoprotein metabolism, *Diabetes Obes Metab* 9 (2007) 640-647.
- [64] Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, *Lancet* 352 (1998) 854-865.
- [65] D. G. Hardie, Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease, *FEBS Lett* 582 (2008) 81-89.
- [66] B. Kola, M. Boscaro, G. A. Rutter, A. B. Grossman, and M. Korbonits, Expanding role of AMPK in endocrinology, *Trends Endocrinol Metab* 17 (2006) 205-215.
- [67] B. Viollet, M. Foretz, B. Guigas, S. Horman, R. Dentin, L. Bertrand, L. Hue, and F. Andreelli, Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders, *J Physiol* 574 (2006) 41-53.
- [68] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, and T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat Med* 8 (2002) 1288-1295.

-
- [69] E. Tomas, T. S. Tsao, A. K. Saha, H. E. Murrey, C. Zhang Cc, S. I. Itani, H. F. Lodish, and N. B. Ruderman, Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 16309-16313.
- [70] H. J. Kim, E. S. Kang, D. J. Kim, S. H. Kim, C. W. Ahn, B. S. Cha, M. Nam, C. H. Chung, K. W. Lee, C. M. Nam, and H. C. Lee, Effects of rosiglitazone and metformin on inflammatory markers and adipokines: decrease in interleukin-18 is an independent factor for the improvement of homeostasis model assessment-beta in type 2 diabetes mellitus, *Clin Endocrinol (Oxf)* 66 (2007) 282-289.
- [71] T. Zhang, J. He, C. Xu, L. Zu, H. Jiang, S. Pu, X. Guo, and G. Xu, Mechanisms of metformin inhibiting lipolytic response to isoproterenol in primary rat adipocytes, *J Mol Endocrinol* 42 (2009) 57-66.
- [72] S. Kersten, Peroxisome proliferator activated receptors and obesity, *Eur J Pharmacol* 440 (2002) 223-234.
- [73] K. M. Kostner, and G. M. Kostner, [Fibrate in lipid metabolism disorders], *Pharm Unserer Zeit* 36 (2007) 114-119.
- [74] A. Hiuge, A. Tenenbaum, N. Maeda, M. Benderly, M. Kumada, E. Z. Fisman, D. Tanne, Z. Matas, T. Hibuse, K. Fujita, H. Nishizawa, Y. Adler, M. Motro, S. Kihara, I. Shimomura, S. Behar, and T. Funahashi, Effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands, bezafibrate and fenofibrate, on adiponectin level, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2007) 635-641.
- [75] K. Oki, J. Koide, S. Nakanishi, R. Nakashima, and K. Yamane, Fenofibrate increases high molecular weight adiponectin in subjects with hypertriglyceridemia, *Endocr J* 54 (2007) 431-435.
- [76] P. Li, Z. Zhu, Y. Lu, and J. G. Granneman, Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 (2005) E617-626.
- [77] C. Fernandes-Santos, R. E. Carneiro, L. de Souza Mendonca, M. B. Aguila, and C. A. Mandarin-de-Lacerda, Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet, *Nutrition* 25 (2009) 818-827.
- [78] A. Zirlik, S. Ernst, A. Leugers, F. Willecke, B. E. Sobel, C. Bode, and T. K. Nordt, Inhibition by fibrates of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in human adipocytes and preadipocytes, *Thromb Haemost* 101 (2009) 1060-1069.
- [79] H. Wu, L. Wei, Y. Bao, J. Lu, P. Huang, Y. Liu, W. Jia, and K. Xiang, Fenofibrate reduces serum retinol-binding protein-4 by suppressing its expression in adipose tissue, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (2009) E628-634.
- [80] T. Toyoda, Y. Kamei, H. Kato, S. Sugita, M. Takeya, T. Suganami, and Y. Ogawa, Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue, *Obesity (Silver Spring)* 16 (2008) 1199-1207.

-
- [81] S. Jeong, and M. Yoon, Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPARalpha in high fat diet-induced obese mice, *Exp Mol Med* 41 (2009) 397-405.
- [82] A. V. Ferreira, G. G. Parreira, L. C. Porto, E. G. Mario, H. L. Del Puerto, A. S. Martins, and L. M. Botion, Fenofibrate prevents orotic acid--induced hepatic steatosis in rats, *Life Sci* 82 (2008) 876-883.
- [83] F. Chang, L. A. Jaber, H. D. Berlie, and M. B. O'Connell, Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists, *Ann Pharmacother* 41 (2007) 973-983.
- [84] A. F. Pfeiffer, Adipose tissue and diabetes therapy: do we hit the target?, *Horm Metab Res* 39 (2007) 734-738.
- [85] H. C. Gerstein, S. Yusuf, J. Bosch, J. Pogue, P. Sheridan, N. Dinccag, M. Hanefeld, B. Hoogwerf, M. Laakso, V. Mohan, J. Shaw, B. Zinman, and R. R. Holman, Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial, *Lancet* 368 (2006) 1096-1105.
- [86] A. Okuno, H. Tamemoto, K. Tobe, K. Ueki, Y. Mori, K. Iwamoto, K. Umesono, Y. Akanuma, T. Fujiwara, H. Horikoshi, Y. Yazaki, and T. Kadowaki, Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats, *J Clin Invest* 101 (1998) 1354-1361.
- [87] G. Boden, P. Cheung, M. Mozzoli, and S. K. Fried, Effect of thiazolidinediones on glucose and fatty acid metabolism in patients with type 2 diabetes, *Metabolism* 52 (2003) 753-759.
- [88] Y. Mori, Y. Murakawa, K. Okada, H. Horikoshi, J. Yokoyama, N. Tajima, and Y. Ikeda, Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients, *Diabetes Care* 22 (1999) 908-912.
- [89] S. Akazawa, F. Sun, M. Ito, E. Kawasaki, and K. Eguchi, Efficacy of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 23 (2000) 1067-1071.
- [90] J. A. Johnson, S. E. Trasino, A. W. Ferrante, Jr., and J. R. Vasselli, Prolonged decrease of adipocyte size after rosiglitazone treatment in high- and low-fat-fed rats, *Obesity (Silver Spring)* 15 (2007) 2653-2663.
- [91] N. Rasouli, U. Raue, L. M. Miles, T. Lu, G. B. Di Gregorio, S. C. Elbein, and P. A. Kern, Pioglitazone improves insulin sensitivity through reduction in muscle lipid and redistribution of lipid into adipose tissue, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (2005) E930-934.
- [92] M. Tiikkainen, A. M. Hakkinen, E. Korshennikova, T. Nyman, S. Makimattila, and H. Yki-Jarvinen, Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes, *Diabetes* 53 (2004) 2169-2176.
- [93] L. Takiya, and S. Chawla, Therapeutic options for the management of type 2 diabetes mellitus, *Am J Manag Care* 8 (2002) 1009-1023; quiz 1024-1007.

-
- [94] Y. Miyazaki, A. Mahankali, E. Wajcberg, M. Bajaj, L. J. Mandarino, and R. A. DeFronzo, Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 4312-4319.
- [95] J. Tonelli, W. Li, P. Kishore, U. B. Pajvani, E. Kwon, C. Weaver, P. E. Scherer, and M. Hawkins, Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes, *Diabetes* 53 (2004) 1621-1629.
- [96] U. B. Pajvani, M. Hawkins, T. P. Combs, M. W. Rajala, T. Doebber, J. P. Berger, J. A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A. H. Xiang, K. M. Utzschneider, S. E. Kahn, J. M. Olefsky, T. A. Buchanan, and P. E. Scherer, Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity, *J Biol Chem* 279 (2004) 12152-12162.
- [97] M. Ricote, J. T. Huang, J. S. Welch, and C. K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function, *J Leukoc Biol* 66 (1999) 733-739.
- [98] G. B. Di Gregorio, A. Yao-Borengasser, N. Rasouli, V. Varma, T. Lu, L. M. Miles, G. Ranganathan, C. A. Peterson, R. E. McGehee, and P. A. Kern, Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone, *Diabetes* 54 (2005) 2305-2313.
- [99] D. G. Johns, Human liver aldehyde oxidase: differential inhibition of oxidation of charged and uncharged substrates, *J Clin Invest* 46 (1967) 1492-1505.
- [100] Y. Moriwaki, T. Yamamoto, and K. Higashino, Distribution and pathophysiologic role of molybdenum-containing enzymes, *Histol Histopathol* 12 (1997) 513-524.
- [101] S. Kitamura, K. Sugihara, and S. Ohta, Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases, *Drug Metab Pharmacokinet* 21 (2006) 83-98.
- [102] E. Garattini, M. Fratelli, and M. Terao, Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry, *Cell Mol Life Sci* 65 (2008) 1019-1048.
- [103] T. K. Kundu, R. Hille, M. Velayutham, and J. L. Zweier, Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues, *Arch Biochem Biophys* 460 (2007) 113-121.
- [104] A. R. Subauste, and C. F. Burant, Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 (2007) E159-164.
- [105] M. C. Vohl, R. Sladek, J. Robitaille, S. Gurd, P. Marceau, D. Richard, T. J. Hudson, and A. Tchernof, A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men, *Obes Res* 12 (2004) 1217-1222.
- [106] I. N. Zelko, T. J. Mariani, and R. J. Folz, Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 337-349.

-
- [107] Y. Li, T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace, and C. J. Epstein, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nat Genet* 11 (1995) 376-381.
- [108] S. Melov, J. A. Schneider, B. J. Day, D. Hinerfeld, P. Coskun, S. S. Mirra, J. D. Crapo, and D. C. Wallace, A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase, *Nat Genet* 18 (1998) 159-163.
- [109] S. Melov, P. Coskun, M. Patel, R. Tuinstra, B. Cottrell, A. S. Jun, T. H. Zastawny, M. Dizdaroglu, S. I. Goodman, T. T. Huang, H. Miziorko, C. J. Epstein, and D. C. Wallace, Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 846-851.
- [110] N. Houstis, E. D. Rosen, and E. S. Lander, Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance, *Nature* 440 (2006) 944-948.
- [111] P. Aguiari, S. Leo, B. Zavan, V. Vindigni, A. Rimessi, K. Bianchi, C. Franzin, R. Cortivo, M. Rossato, R. Vettor, G. Abatangelo, T. Pozzan, P. Pinton, and R. Rizzuto, High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 1226-1231.
- [112] S. Lechpammer, M. W. Epperly, S. Zhou, S. Nie, J. Glowacki, and J. S. Greenberger, Adipocyte differentiation in *Sod2*(-/-) and *Sod2*(+/+) murine bone marrow stromal cells is associated with low antioxidant pools, *Exp Hematol* 33 (2005) 1201-1208.
- [113] V. Gerke, and S. E. Moss, Annexins: from structure to function, *Physiol Rev* 82 (2002) 331-371.
- [114] M. J. Hayes, and S. E. Moss, Annexins and disease, *Biochem Biophys Res Commun* 322 (2004) 1166-1170.
- [115] J. Huang, S. H. Hsia, T. Imamura, I. Usui, and J. M. Olefsky, Annexin II is a thiazolidinedione-responsive gene involved in insulin-induced glucose transporter isoform 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes, *Endocrinology* 145 (2004) 1579-1586.
- [116] J. P. Warne, C. D. John, H. C. Christian, J. F. Morris, R. J. Flower, D. Sugden, E. Solito, G. E. Gillies, and J. C. Buckingham, Gene deletion reveals roles for annexin A1 in the regulation of lipolysis and IL-6 release in epididymal adipose tissue, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291 (2006) E1264-1273.
- [117] W. T. Wong, H. S. Nick, and S. C. Frost, Regulation of annexin I in adipogenesis: cAMP-independent action of methylisobutylxanthine, *Am J Physiol* 262 (1992) C91-97.
- [118] M. Bluher, L. Wilson-Fritch, J. Leszyk, P. G. Laustsen, S. Corvera, and C. R. Kahn, Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes, *J Biol Chem* 279 (2004) 31902-31909.
- [119] L. Cubells, S. Vila de Muga, F. Tebar, P. Wood, R. Evans, M. Ingelmo-Torres, M. Calvo, K. Gaus, A. Pol, T. Grewal, and C. Enrich, Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex, *Traffic* 8 (2007) 1568-1589.

-
- [120] F. Stogbauer, J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, D. Sporrer, M. Weber, A. Schffler, C. Enrich, P. Wood, T. Grewal, C. Aslanidis, and C. Buechler, Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro, *Exp Mol Med* (2009).
- [121] R. Z. Yang, M. J. Lee, H. Hu, J. Pray, H. B. Wu, B. C. Hansen, A. R. Shuldiner, S. K. Fried, J. C. McLenithan, and D. W. Gong, Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (2006) E1253-1261.
- [122] J. K. Lee, J. Schnee, M. Pang, M. Wolfert, L. G. Baum, K. W. Moremen, and M. Pierce, Human homologs of the *Xenopus* oocyte cortical granule lectin XL35, *Glycobiology* 11 (2001) 65-73.
- [123] Y. A. Suzuki, K. Shin, and B. Lonnerdal, Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor, *Biochemistry* 40 (2001) 15771-15779.
- [124] S. Tsuji, J. Uehori, M. Matsumoto, Y. Suzuki, A. Matsuhisa, K. Toyoshima, and T. Seya, Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall, *J Biol Chem* 276 (2001) 23456-23463.
- [125] S. M. Dann, and L. Eckmann, Innate immune defenses in the intestinal tract, *Curr Opin Gastroenterol* 23 (2007) 115-120.
- [126] T. Komiya, Y. Tanigawa, and S. Hirohashi, Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth cells in mice, *Biochem Biophys Res Commun* 251 (1998) 759-762.
- [127] A. D. Pemberton, P. A. Knight, J. Gamble, W. H. Colledge, J. K. Lee, M. Pierce, and H. R. Miller, Innate BALB/c enteric epithelial responses to *Trichinella spiralis*: inducible expression of a novel goblet cell lectin, intelectin-2, and its natural deletion in C57BL/10 mice, *J Immunol* 173 (2004) 1894-1901.
- [128] S. Tsuji, M. Yamashita, D. R. Hoffman, A. Nishiyama, T. Shinohara, T. Ohtsu, and Y. Shibata, Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin by intelectin-1 deposited on cell surfaces, *Glycobiology* 19 (2009) 518-526.
- [129] S. Wurm, M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, and C. Buechler, Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults, *Cardiovasc Diabetol* 6 (2007) 7.
- [130] C. M. de Souza Batista, R. Z. Yang, M. J. Lee, N. M. Glynn, D. Z. Yu, J. Pray, K. Ndubizu, S. Patil, A. Schwartz, M. Kligman, S. K. Fried, D. W. Gong, A. R. Shuldiner, T. I. Pollin, and J. C. McLenithan, Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity, *Diabetes* 56 (2007) 1655-1661.
- [131] B. K. Tan, R. Adya, S. Farhatullah, K. C. Lewandowski, P. O'Hare, H. Lehnert, and H. S. Randeva, Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: ex vivo and in vivo regulation of omentin-1 by insulin and glucose, *Diabetes* 57 (2008) 801-808.

-
- [132] B. K. Tan, S. Pua, F. Syed, K. C. Lewandowski, J. P. O'Hare, and H. S. Randeva, Decreased plasma omentin-1 levels in Type 1 diabetes mellitus, *Diabet Med* 25 (2008) 1254-1255.
- [133] A. Schaffler, M. Neumeier, H. Herfarth, A. Furst, J. Scholmerich, and C. Buchler, Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue, *Biochim Biophys Acta* 1732 (2005) 96-102.
- [134] D. A. Kuperman, C. C. Lewis, P. G. Woodruff, M. W. Rodriguez, Y. H. Yang, G. M. Dolganov, J. V. Fahy, and D. J. Erle, Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics, *J Allergy Clin Immunol* 116 (2005) 305-311.
- [135] A. D. Pemberton, M. J. Rose-Zerilli, J. W. Holloway, R. D. Gray, and S. T. Holgate, A single-nucleotide polymorphism in intelectin 1 is associated with increased asthma risk, *J Allergy Clin Immunol* 122 (2008) 1033-1034.
- [136] R. Wiest, F. Leidl, A. Kopp, J. Weigert, M. Neumeier, C. Buechler, J. Schoelmerich, and A. Schaffler, Peritoneal fluid adipokines: ready for prime time?, *Eur J Clin Invest* 39 (2009) 219-229.
- [137] A. Wali, P. J. Morin, C. D. Hough, F. Lonardo, T. Seya, M. Carbone, and H. I. Pass, Identification of intelectin overexpression in malignant pleural mesothelioma by serial analysis of gene expression (SAGE), *Lung Cancer* 48 (2005) 19-29.
- [138] A. P. Mogal, R. van der Meer, P. S. Crooke, and S. A. Abdulkadir, Haploinsufficient prostate tumor suppression by Nkx3.1: a role for chromatin accessibility in dosage-sensitive gene regulation, *J Biol Chem* 282 (2007) 25790-25800.
- [139] J. Domic, S. Dabelic, and M. Flogel, Galectin-3: an open-ended story, *Biochim Biophys Acta* 1760 (2006) 616-635.
- [140] N. Ahmad, H. J. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, S. Sabesan, R. Roy, B. Liu, F. Macaluso, and C. F. Brewer, Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes, *J Biol Chem* 279 (2004) 10841-10847.
- [141] F. T. Liu, R. J. Patterson, and J. L. Wang, Intracellular functions of galectins, *Biochim Biophys Acta* 1572 (2002) 263-273.
- [142] S. Nakahara, and A. Raz, Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway, *Cancer Metastasis Rev* 26 (2007) 605-610.
- [143] J. Ochieng, V. Furtak, and P. Lukyanov, Extracellular functions of galectin-3, *Glycoconj J* 19 (2004) 527-535.
- [144] S. F. Dagher, J. L. Wang, and R. J. Patterson, Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 1213-1217.
- [145] H. Sano, D. K. Hsu, L. Yu, J. R. Apgar, I. Kuwabara, T. Yamanaka, M. Hirashima, and F. T. Liu, Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages, *J Immunol* 165 (2000) 2156-2164.

-
- [146] D. K. Hsu, A. I. Chernyavsky, H. Y. Chen, L. Yu, S. A. Grando, and F. T. Liu, Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells, *J Invest Dermatol* 129 (2009) 573-583.
- [147] L. Frol'ova, K. Smetana, Jr., D. Borovska, A. Kitanovicova, K. Klimesova, I. Janatkova, K. Malickova, M. Lukas, P. Drastich, Z. Benes, L. Tuckova, J. C. Manning, S. Andre, H. J. Gabius, and H. Tlaskalova-Hogenova, Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD?, *Inflamm Res* (2009).
- [148] E. H. Kang, K. C. Moon, E. Y. Lee, Y. J. Lee, E. B. Lee, C. Ahn, and Y. W. Song, Renal expression of galectin-3 in systemic lupus erythematosus patients with nephritis, *Lupus* 18 (2009) 22-28.
- [149] Y. Matsuda, Y. Yamagiwa, K. Fukushima, Y. Ueno, and T. Shimosegawa, Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma, *Hepatol Res* 38 (2008) 1098-1111.
- [150] M. Sakaki, N. Oka, R. Nakanishi, K. Yamaguchi, T. Fukumori, and H. O. Kanayama, Serum level of galectin-3 in human bladder cancer, *J Med Invest* 55 (2008) 127-132.
- [151] P. Vereecken, K. Zouaoui Boudjeltia, C. Debray, A. Awada, I. Legssyer, F. Sales, M. Petein, M. Vanhaeverbeek, G. Ghanem, and M. Heenen, High serum galectin-3 in advanced melanoma: preliminary results, *Clin Exp Dermatol* 31 (2006) 105-109.
- [152] E. P. Mensah-Brown, Z. Al Rabesi, A. Shahin, M. Al Shamsi, N. Arsenijevic, D. K. Hsu, F. T. Liu, and M. L. Lukic, Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice, *Clin Immunol* 130 (2009) 83-88.
- [153] M. Nachtigal, A. Ghaffar, and E. P. Mayer, Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice, *Am J Pathol* 172 (2008) 247-255.
- [154] D. K. Hsu, R. Y. Yang, Z. Pan, L. Yu, D. R. Salomon, W. P. Fung-Leung, and F. T. Liu, Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses, *Am J Pathol* 156 (2000) 1073-1083.
- [155] M. Papaspyridonos, E. McNeill, J. P. de Bono, A. Smith, K. G. Burnand, K. M. Channon, and D. R. Greaves, Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 433-440.
- [156] W. Zhu, H. Sano, R. Nagai, K. Fukuhara, A. Miyazaki, and S. Horiuchi, The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins, *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 1183-1188.
- [157] H. Vlassara, Y. M. Li, F. Imani, D. Wojciechowicz, Z. Yang, F. T. Liu, and A. Cerami, Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex, *Mol Med* 1 (1995) 634-646.

-
- [158] C. Iacobini, S. Menini, C. Ricci, A. Scipioni, V. Sansoni, S. Cordone, M. Taurino, M. Serino, G. Marano, M. Federici, F. Pricci, and G. Pugliese, Accelerated lipid-induced atherogenesis in galectin-3-deficient mice: role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009) 831-836.
- [159] S. Rahbar, The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems, *Ann N Y Acad Sci* 1043 (2005) 9-19.
- [160] P. J. Beisswenger, B. S. Szwegold, and K. T. Yeo, Glycated proteins in diabetes, *Clin Lab Med* 21 (2001) 53-78, vi.
- [161] C. Iacobini, S. Menini, G. Oddi, C. Ricci, L. Amadio, F. Pricci, A. Olivieri, M. Sorcini, U. Di Mario, C. Pesce, and G. Pugliese, Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor, *Faseb J* 18 (2004) 1773-1775.
- [162] K. Nomoto, K. Tsuneyama, H. O. Abdel Aziz, H. Takahashi, Y. Murai, Z. G. Cui, M. Fujimoto, I. Kato, K. Hiraga, D. K. Hsu, F. T. Liu, and Y. Takano, Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice, *J Pathol* 210 (2006) 469-477.
- [163] Y. Nakanishi, K. Tsuneyama, K. Nomoto, M. Fujimoto, T. L. Salunga, T. Nakajima, S. Miwa, Y. Murai, S. Hayashi, I. Kato, K. Hiraga, D. K. Hsu, F. T. Liu, and Y. Takano, Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice, *Hepatol Res* 38 (2008) 1241-1251.
- [164] K. Kiwaki, C. M. Novak, D. K. Hsu, F. T. Liu, and J. A. Levine, Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue, *Obesity (Silver Spring)* 15 (2007) 32-39.
- [165] K. Bozaoglu, K. Bolton, J. McMillan, P. Zimmet, J. Jowett, G. Collier, K. Walder, and D. Segal, Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome, *Endocrinology* 148 (2007) 4687-4694.
- [166] K. B. Goralski, T. C. McCarthy, E. A. Hanniman, B. A. Zabel, E. C. Butcher, S. D. Parlee, S. Muruganandan, and C. J. Sinal, Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism, *J Biol Chem* 282 (2007) 28175-28188.
- [167] S. G. Roh, S. H. Song, K. C. Choi, K. Katoh, V. Wittamer, M. Parmentier, and S. Sasaki, Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 362 (2007) 1013-1018.
- [168] S. Nagpal, S. Patel, H. Jacobe, D. DiSepio, C. Ghosn, M. Malhotra, M. Teng, M. Duvic, and R. A. Chandraratna, Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin, *J Invest Dermatol* 109 (1997) 91-95.
- [169] B. A. Zabel, S. J. Allen, P. Kulig, J. A. Allen, J. Cichy, T. M. Handel, and E. C. Butcher, Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades, *J Biol Chem* 280 (2005) 34661-34666.
- [170] C. H. Kim, The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond, *Curr Opin Hematol* 12 (2005) 298-304.

-
- [171] W. Meder, M. Wendland, A. Busmann, C. Kutzleb, N. Spodsberg, H. John, R. Richter, D. Schleuder, M. Meyer, and W. G. Forssmann, Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23, *FEBS Lett* 555 (2003) 495-499.
- [172] A. Methner, G. Hermey, B. Schinke, and I. Hermans-Borgmeyer, A novel G protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development, *Biochem Biophys Res Commun* 233 (1997) 336-342.
- [173] M. Samson, A. L. Edinger, P. Stordeur, J. Rucker, V. Verhasselt, M. Sharron, C. Govaerts, C. Mollereau, G. Vassart, R. W. Doms, and M. Parmentier, ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains, *Eur J Immunol* 28 (1998) 1689-1700.
- [174] V. Wittamer, J. D. Franssen, M. Vulcano, J. F. Mirjolet, E. Le Poul, I. Migeotte, S. Brezillon, R. Tyldesley, C. Blanpain, M. Detheux, A. Mantovani, S. Sozzani, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi, Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids, *J Exp Med* 198 (2003) 977-985.
- [175] B. A. Zabel, A. M. Silverio, and E. C. Butcher, Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood, *J Immunol* 174 (2005) 244-251.
- [176] S. Parolini, A. Santoro, E. Marcenaro, W. Luini, L. Massardi, F. Facchetti, D. Communi, M. Parmentier, A. Majorana, M. Sironi, G. Tabellini, A. Moretta, and S. Sozzani, The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues, *Blood* 109 (2007) 3625-3632.
- [177] W. Vermi, E. Riboldi, V. Wittamer, F. Gentili, W. Luini, S. Marrelli, A. Vecchi, J. D. Franssen, D. Communi, L. Massardi, M. Sironi, A. Mantovani, M. Parmentier, F. Facchetti, and S. Sozzani, Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin, *J Exp Med* 201 (2005) 509-515.
- [178] T. Yoshimura, and J. J. Oppenheim, Chemerin reveals its chimeric nature, *J Exp Med* 205 (2008) 2187-2190.
- [179] V. Wittamer, F. Gregoire, P. Robberecht, G. Vassart, D. Communi, and M. Parmentier, The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency, *J Biol Chem* 279 (2004) 9956-9962.
- [180] J. L. Cash, R. Hart, A. Russ, J. P. Dixon, W. H. Colledge, J. Doran, A. G. Hendrick, M. B. Carlton, and D. R. Greaves, Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23, *J Exp Med* 205 (2008) 767-775.
- [181] B. K. Tan, J. Chen, S. Farhatullah, R. Adya, J. Kaur, D. Heutling, K. C. Lewandowski, J. P. O'Hare, H. Lehnert, and H. S. Randeva, Insulin and Metformin Regulate Circulating and Adipose Tissue Chemerin, *Diabetes* (2009).
- [182] M. Takahashi, Y. Takahashi, K. Takahashi, F. N. Zolotaryov, K. S. Hong, R. Kitazawa, K. Iida, Y. Okimura, H. Kaji, S. Kitazawa, M. Kasuga, and K. Chihara,

Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, *FEBS Lett* 582 (2008) 573-578.

[183] S. Kralisch, S. Weise, G. Sommer, J. Lipfert, U. Lossner, M. Bluher, M. Stumvoll, and M. Fasshauer, Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro, *Regul Pept* 154 (2009) 102-106.

[184] M. Lehrke, A. Becker, M. Greif, R. Stark, R. Laubender, F. von Ziegler, C. Lebherz, J. Tittus, M. Reiser, C. Becker, B. Goke, A. Leber, K. Parhofer, and U. Broedl, Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis, *Eur J Endocrinol* (2009).

[185] D. Stejskal, M. Karpisek, Z. Hanulova, and M. Svestak, Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 152 (2008) 217-221.

[186] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.

[187] J. Heukeshoven, and R. Dernick, Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels, *Electrophoresis* 9 (1988) 28-32.

[188] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979, *Biotechnology* 24 (1992) 145-149.

[189] D. Ortega, A. Pol, M. Biermer, S. Jackle, and C. Enrich, Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes, *J Cell Sci* 111 (Pt 2) (1998) 261-269.

[190] T. Grewal, J. Heeren, D. Mewawala, T. Schnitgerhans, D. Wendt, G. Salomon, C. Enrich, U. Beisiegel, and S. Jackle, Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment, *J Biol Chem* 275 (2000) 33806-33813.

[191] S. Vila de Muga, P. Timpson, L. Cubells, R. Evans, T. E. Hayes, C. Rentero, A. Hegemann, M. Reverter, J. Leschner, A. Pol, F. Tebar, R. J. Daly, C. Enrich, and T. Grewal, Annexin A6 inhibits Ras signalling in breast cancer cells, *Oncogene* 28 (2009) 363-377.

[192] J. M. Ntambi, and K. Young-Cheul, Adipocyte differentiation and gene expression, *J Nutr* 130 (2000) 3122S-3126S.

[193] H. Green, and M. Meuth, An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture, *Cell* 3 (1974) 127-133.

[194] H. Green, and O. Kehinde, An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion, *Cell* 5 (1975) 19-27.

[195] P. E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish, A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *J Biol Chem* 270 (1995) 26746-26749.

-
- [196] F. M. Gregoire, C. M. Smas, and H. S. Sul, Understanding adipocyte differentiation, *Physiol Rev* 78 (1998) 783-809.
- [197] R. M. Cowherd, R. E. Lyle, and R. E. McGehee, Jr., Molecular regulation of adipocyte differentiation, *Semin Cell Dev Biol* 10 (1999) 3-10.
- [198] A. Schaffler, A. Ehling, E. Neumann, H. Herfarth, G. Paul, I. Tarner, S. Gay, C. Buechler, J. Scholmerich, and U. Muller-Ladner, Role of specificity protein-1, PPARgamma, and pituitary protein transcription factor-1 in transcriptional regulation of the murine CORS-26 promoter, *Biochim Biophys Acta* 1678 (2004) 150-156.
- [199] C. C. Mello, and D. Conte, Jr., Revealing the world of RNA interference, *Nature* 431 (2004) 338-342.
- [200] H. C. Birnboim, A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA, *Methods Enzymol* 100 (1983) 243-255.
- [201] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001.
- [202] H. F. Lodish, *Molekulare Zellbiologie*, ed., Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg 2001.
- [203] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1 (1986) 263-273.
- [204] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Biotechnology* 24 (1992) 104-108.
- [205] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150 (1985) 76-85.
- [206] J. Speakman, C. Hambly, S. Mitchell, and E. Krol, The contribution of animal models to the study of obesity, *Lab Anim* 42 (2008) 413-432.
- [207] S. Collins, T. L. Martin, R. S. Surwit, and J. Robidoux, Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics, *Physiol Behav* 81 (2004) 243-248.
- [208] S. Andrikopoulos, C. M. Massa, K. Aston-Mourney, A. Funkat, B. C. Fam, R. L. Hull, S. E. Kahn, and J. Proietto, Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet, *J Endocrinol* 187 (2005) 45-53.
- [209] R. Buettner, J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents, *Obesity (Silver Spring)* 15 (2007) 798-808.
- [210] R. Buettner, K. G. Parhofer, M. Woenckhaus, C. E. Wrede, L. A. Kunz-Schughart, J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer, Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types, *J Mol Endocrinol* 36 (2006) 485-501.

-
- [211] D. Chen, and M. W. Wang, Development and application of rodent models for type 2 diabetes, *Diabetes Obes Metab* 7 (2005) 307-317.
- [212] M. S. Phillips, Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey, and J. F. Hess, Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat Genet* 13 (1996) 18-19.
- [213] S. Fredersdorf, J. Weil, C. Ulucan, C. Birner, R. Buttner, T. Schubert, C. A. Boger, K. Debl, F. Muders, G. A. Riegger, and A. Luchner, Vasozeptidase inhibition attenuates proteinuria and podocyte injury in Zucker diabetic fatty rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375 (2007) 95-103.
- [214] S. Fredersdorf, D. H. Endemann, A. Luchner, D. Heitzmann, C. Ulucan, C. Birner, P. Schmid, B. Stoelcker, M. Resch, F. Muders, G. A. Riegger, and J. Weil, Increased aldosterone levels in a model of type 2 diabetes mellitus, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117 (2009) 15-20.
- [215] R. Ness-Abramof, and C. M. Apovian, Waist circumference measurement in clinical practice, *Nutr Clin Pract* 23 (2008) 397-404.
- [216] V. Catalan, J. Gomez-Ambrosi, F. Rotellar, C. Silva, A. Rodriguez, J. Salvador, M. J. Gil, J. A. Cienfuegos, and G. Fruhbeck, Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus, *Horm Metab Res* 39 (2007) 495-500.
- [217] A. Sigrüener, C. Buechler, E. Orso, A. Hartmann, P. J. Wild, L. Terracciano, M. Roncalli, S. R. Bornstein, and G. Schmitz, Human aldehyde oxidase 1 interacts with ATP-binding cassette transporter-1 and modulates its activity in hepatocytes, *Horm Metab Res* 39 (2007) 781-789.
- [218] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, T. S. Weiss, C. Schmidl, R. Buttner, C. Bollheimer, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* 350 (2006) 731-735.
- [219] R. S. Obach, P. Huynh, M. C. Allen, and C. Beedham, Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs, *J Clin Pharmacol* 44 (2004) 7-19.
- [220] A. Chawla, E. J. Schwarz, D. D. Dimaculangan, and M. A. Lazar, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation, *Endocrinology* 135 (1994) 798-800.
- [221] P. Tontonoz, E. Hu, and B. M. Spiegelman, Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor, *Cell* 79 (1994) 1147-1156.
- [222] K. E. Fox, D. M. Fankell, P. F. Erickson, S. M. Majka, J. T. Crossno, Jr., and D. J. Klemm, Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2, *J Biol Chem* 281 (2006) 40341-40353.
- [223] O. A. MacDougald, and M. D. Lane, Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation, *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 345-373.

-
- [224] R. A. Srivastava, R. Jahagirdar, S. Azhar, S. Sharma, and C. L. Bisgaier, Peroxisome proliferator-activated receptor- α selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice, *Mol Cell Biochem* 285 (2006) 35-50.
- [225] J. M. Ntambi, The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD), *Prog Lipid Res* 34 (1995) 139-150.
- [226] P. D. Cani, J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J. F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi, and R. Burcelin, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes* 56 (2007) 1761-1772.
- [227] M. Yuan, N. Konstantopoulos, J. Lee, L. Hansen, Z. W. Li, M. Karin, and S. E. Shoelson, Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β , *Science* 293 (2001) 1673-1677.
- [228] G. Jiang, and B. B. Zhang, Modulation of insulin signalling by insulin sensitizers, *Biochem Soc Trans* 33 (2005) 358-361.
- [229] M. Qatanani, and M. A. Lazar, Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu, *Genes Dev* 21 (2007) 1443-1455.
- [230] G. Ranganathan, R. Unal, I. Pokrovskaya, A. Yao-Borengasser, B. Phanavanh, B. Lecka-Czernik, N. Rasouli, and P. A. Kern, The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment, *J Lipid Res* 47 (2006) 2444-2450.
- [231] T. Inokuchi, Z. Tsutsumi, S. Takahashi, T. Ka, A. Yamamoto, Y. Moriwaki, H. Masuzaki, and T. Yamamoto, Effects of benzbromarone and allopurinol on adiponectin in vivo and in vitro, *Horm Metab Res* 41 (2009) 327-332.
- [232] K. T. Dalen, K. Schoonjans, S. M. Ulven, M. S. Weedon-Fekjaer, T. G. Bentzen, H. Koutnikova, J. Auwerx, and H. I. Nebb, Adipose tissue expression of the lipid droplet-associated proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor- γ , *Diabetes* 53 (2004) 1243-1252.
- [233] J. M. Ntambi, M. Miyazaki, J. P. Stoeckl, H. Lan, C. M. Kendziora, B. S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J. M. Friedman, and A. D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 11482-11486.
- [234] A. Cabrero, M. Alegret, R. M. Sanchez, T. Adzet, J. C. Laguna, and M. Vazquez, Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes, *Diabetes* 50 (2001) 1883-1890.
- [235] S. Nakano, Y. Inada, H. Masuzaki, T. Tanaka, S. Yasue, T. Ishii, N. Arai, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Maruyama, Y. Yamazaki, N. Shibata, and K. Nakao, Bezafibrate regulates the expression and enzyme activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E1213-1222.

-
- [236] J. E. Davis, N. K. Gabler, J. Walker-Daniels, and M. E. Spurlock, The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes, *Horm Metab Res* 41 (2009) 523-530.
- [237] W. T. Garvey, J. M. Olefsky, S. Matthaei, and S. Marshall, Glucose and insulin co-regulate the glucose transport system in primary cultured adipocytes. A new mechanism of insulin resistance, *J Biol Chem* 262 (1987) 189-197.
- [238] A. Guilherme, J. V. Virbasius, V. Puri, and M. P. Czech, Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 367-377.
- [239] A. Mey, H. Leffler, Z. Hmama, G. Normier, and J. P. Revillard, The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites, *J Immunol* 156 (1996) 1572-1577.
- [240] J. Han, M. Takenaka, T. P. Talorete, N. Funamizu, and H. Isoda, Toxicity assessment of wastewater by proteomics analysis, *Environ Sci* 14 Suppl (2007) 35-41.
- [241] A. C. MacKinnon, S. L. Farnworth, P. S. Hodgkinson, N. C. Henderson, K. M. Atkinson, H. Leffler, U. J. Nilsson, C. Haslett, S. J. Forbes, and T. Sethi, Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3, *J Immunol* 180 (2008) 2650-2658.
- [242] B. A. Zabel, T. Ohyama, L. Zuniga, J. Y. Kim, B. Johnston, S. J. Allen, D. G. Guido, T. M. Handel, and E. C. Butcher, Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands, *Exp Hematol* 34 (2006) 1106-1114.
- [243] F. M. Fisher, P. G. McTernan, G. Valsamakis, R. Chetty, A. L. Harte, A. J. Anwar, J. Starcynski, J. Crocker, A. H. Barnett, C. L. McTernan, and S. Kumar, Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status, *Horm Metab Res* 34 (2002) 650-654.
- [244] M. A. Statnick, L. S. Beavers, L. J. Conner, H. Corominola, D. Johnson, C. D. Hammond, R. Rafaeloff-Phail, T. Seng, T. M. Suter, J. P. Sluka, E. Ravussin, R. A. Gadski, and J. F. Caro, Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes, *Int J Exp Diabetes Res* 1 (2000) 81-88.
- [245] P. Rao, Z. H. Huang, and T. Mazzone, Angiotensin II regulates adipocyte apolipoprotein E expression, *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2007) 4366-4372.
- [246] R. Zechner, R. Moser, T. C. Newman, S. K. Fried, and J. L. Breslow, Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content, *J Biol Chem* 266 (1991) 10583-10588.
- [247] H. Wassef, L. Bernier, J. Davignon, and J. S. Cohn, Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells, *J Nutr* 134 (2004) 2935-2941.
- [248] L. Yue, N. Rasouli, G. Ranganathan, P. A. Kern, and T. Mazzone, Divergent effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists and tumor necrosis factor alpha on adipocyte ApoE expression, *J Biol Chem* 279 (2004) 47626-47632.

-
- [249] Z. H. Huang, D. Gu, and T. Mazzone, Role of adipocyte-derived apoE in modulating adipocyte size, lipid metabolism, and gene expression in vivo, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (2009) E1110-1119.
- [250] J. R. Zierath, J. N. Livingston, A. Thorne, J. Bolinder, S. Reynisdottir, F. Lonnqvist, and P. Arner, Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway, *Diabetologia* 41 (1998) 1343-1354.
- [251] K. M. Pou, J. M. Massaro, U. Hoffmann, R. S. Vasan, P. Maurovich-Horvat, M. G. Larson, J. F. Keaney, Jr., J. B. Meigs, I. Lipinska, S. Kathiresan, J. M. Murabito, C. J. O'Donnell, E. J. Benjamin, and C. S. Fox, Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study, *Circulation* 116 (2007) 1234-1241.
- [252] M. Ritter, C. Buechler, T. Langmann, and G. Schmitz, Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily, *Biochem Biophys Res Commun* 260 (1999) 466-474.
- [253] J. M. Bruun, A. S. Lihn, S. B. Pedersen, and B. Richelsen, Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT, *J Clin Endocrinol Metab* 90 (2005) 2282-2289.
- [254] H. P. Jiang, and G. Serrero, Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 7856-7860.
- [255] D. L. Brasaemle, T. Barber, N. E. Wolins, G. Serrero, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos, Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein, *J Lipid Res* 38 (1997) 2249-2263.
- [256] P. E. Bickel, P. E. Scherer, J. E. Schnitzer, P. Oh, M. P. Lisanti, and H. F. Lodish, Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins, *J Biol Chem* 272 (1997) 13793-13802.
- [257] T. Babuke, and R. Tikkanen, Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins, *Eur J Cell Biol* 86 (2007) 525-532.
- [258] M. Jiang, L. Jia, W. Jiang, X. Hu, H. Zhou, X. Gao, Z. Lu, and Z. Zhang, Protein dysregulation in red blood cell membranes of type 2 diabetic patients, *Biochem Biophys Res Commun* 309 (2003) 196-200.
- [259] R. Drolet, C. Richard, A. D. Sniderman, J. Mailloux, M. Fortier, C. Huot, C. Rheume, and A. Tchernof, Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women, *Int J Obes (Lond)* 32 (2008) 283-291.
- [260] M. Stumvoll, B. J. Goldstein, and T. W. van Haeften, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet* 365 (2005) 1333-1346.

-
- [261] A. Aronis, Z. Madar, and O. Tirosh, Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis, *Free Radic Biol Med* 38 (2005) 1221-1230.
- [262] R. M. Wright, M. G. Riley, L. K. Weigel, L. A. Ginger, D. A. Costantino, and J. L. McManaman, Activation of the human aldehyde oxidase (hAOX1) promoter by tandem cooperative Sp1/Sp3 binding sites: identification of complex architecture in the hAOX upstream DNA that includes a proximal promoter, distal activation sites, and a silencer element, *DNA Cell Biol* 19 (2000) 459-474.
- [263] Q. Zhu, and K. Liao, Differential expression of the adipocyte amino acid transporter is transactivated by SP1 and SP3 during the 3T3-L1 preadipocyte differentiation process, *Biochem Biophys Res Commun* 271 (2000) 100-106.
- [264] A. Schaffler, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, and C. Buchler, Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases, *Endocr Rev* 27 (2006) 449-467.
- [265] J. Mercader, J. Ribot, I. Murano, F. Felipe, S. Cinti, M. L. Bonet, and A. Palou, Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice, *Endocrinology* 147 (2006) 5325-5332.
- [266] D. Y. Huang, and Y. Ichikawa, Two different enzymes are primarily responsible for retinoic acid synthesis in rabbit liver cytosol, *Biochem Biophys Res Commun* 205 (1994) 1278-1283.
- [267] A. Negre-Salvayre, C. Coatrieux, C. Ingueneau, and R. Salvayre, Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors, *Br J Pharmacol* 153 (2008) 6-20.
- [268] A. F. Soares, M. Guichardant, D. Cozzone, N. Bernoud-Hubac, N. Bouzaidi-Tiali, M. Lagarde, and A. Geloën, Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes, *Free Radic Biol Med* 38 (2005) 882-889.
- [269] S. Le Lay, M. B. C, E. Hajdúch, and I. Dugail, Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency, *Biochim Biophys Acta* 1791 (2009) 514-518.
- [270] L. Makowski, and G. S. Hotamisligil, The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 16 (2005) 543-548.
- [271] G. S. Hotamisligil, R. S. Johnson, R. J. Distel, R. Ellis, V. E. Papaioannou, and B. M. Spiegelman, Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein, *Science* 274 (1996) 1377-1379.
- [272] L. Makowski, J. B. Boord, K. Maeda, V. R. Babaev, K. T. Uysal, M. A. Morgan, R. A. Parker, J. Suttles, S. Fazio, G. S. Hotamisligil, and M. F. Linton, Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis, *Nat Med* 7 (2001) 699-705.
- [273] O. S. Al-Attas, N. M. Al-Daghri, K. Al-Rubeaan, N. F. da Silva, S. L. Sabico, S. Kumar, P. G. McTernan, and A. L. Harte, Changes in endotoxin levels in T2DM subjects on anti-diabetic therapies, *Cardiovasc Diabetol* 8 (2009) 20.

-
- [274] G. Boden, Obesity and free fatty acids, *Endocrinol Metab Clin North Am* 37 (2008) 635-646, viii-ix.
- [275] A. Anedda, E. Rial, and M. M. Gonzalez-Barroso, Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels, *J Endocrinol* 199 (2008) 33-40.
- [276] T. Yamauchi, Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki, Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat Med* 13 (2007) 332-339.
- [277] J. A. Meyers, A. Y. Liu, A. McTiernan, M. H. Wener, B. Wood, D. S. Weigle, B. Sorensen, Z. Chen-Levy, Y. Yasui, A. Boynton, J. D. Potter, and C. M. Ulrich, Serum leptin concentrations and markers of immune function in overweight or obese postmenopausal women, *J Endocrinol* 199 (2008) 51-60.
- [278] C. Cederfur, E. Salomonsson, J. Nilsson, A. Halim, C. T. Oberg, G. Larson, U. J. Nilsson, and H. Leffler, Different affinity of galectins for human serum glycoproteins: galectin-3 binds many protease inhibitors and acute phase proteins, *Glycobiology* 18 (2008) 384-394.
- [279] M. Kristiansen, J. H. Graversen, C. Jacobsen, O. Sonne, H. J. Hoffman, S. K. Law, and S. K. Moestrup, Identification of the haemoglobin scavenger receptor, *Nature* 409 (2001) 198-201.